

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“ESTUDIO GENÓMICO DE LOS AISLADOS GEOGRÁFICOS DEL
VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

RICARDO VALENCIA YAÑEZ

ENSENADA B. C. MÉXICO.

DICIEMBRE DE 2004.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO GENÓMICO DE LOS AISLADOS GEOGRÁFICOS
DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

RICARDO VALENCIA YAÑEZ

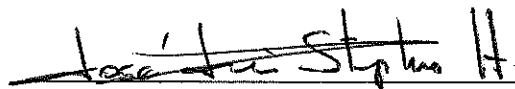
APROBADO POR:



**DR. JORGE DE LA ROSA VÉLEZ
PRESIDENTE DEL JURADO**



**DR. FAUSTINO CAMARENA ROSALES
SECRETARIO**



**DR. JOSÉ LUIS STEPHANO HORNEDO
PRIMER VOCAL**

ENSENADA B. C. MÉXICO.

DICIEMBRE DE 2004.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia

Teresa Yañez Durán, David Valencia Monroy, Fabiola Valencia Yañez, Cecilia Valencia Yañez, Rebeca Yañez Durán. Papá, mamá, flaca, gorda, queka.

“GRACIAS”

Por haberme apoyado siempre. Ojalá que llegue pronto el día en el que pueda retribuir con creces todo aquello que me han dado, lo que me han enseñado, cada quien a su manera y en su tiempo. Estuve pensando durante mucho tiempo en ¿qué escribiría en este momento? postergándolo lo más posible, pero el tiempo me ha alcanzado ya como lo hace siempre y ahora está empujando hacia delante como un “Diablillo” con su trinche y no me permite voltear a mirar atrás. Es por eso que en estas líneas hablaré de cómo estoy en este instante. Ahora, me siento justo sobre la línea que divide una parte de mi vida de otra, y sé que en el momento en el que la cruce estarán ustedes apoyándome, y que cuan lejos esté, estarán conmigo siempre; les doy las gracias por eso. Espero que pronto se sientan tan orgullosos de mí, como orgulloso estoy de ustedes.

A mis profesores y amigos

Dr. Faustino Camarena Rosales, Dr. Francisco Correa Sandoval, Dr. Jorge de la Rosa Vélez, Dr. Eugenio Carpizo Ituarte, M.C. Luis Enríquez Paredes, Dra. Meredith Gould Chambers, Dr. José Luis Stephano Hornedo, Dra. María del Refugio González (cuquita), M.C. Josefina Ramos Paredes (Jose), M.C. Miguel Humberto Carrillo Mendívil, M.C. Evarista Arellano García, Salvador Velásquez Magaña (chava) y M.C. Yenneli Cedano Thomas.

“GRACIAS”

Remembranza: uno de los primeros recuerdos que guardo del inicio de la “carrera”, es una de las clases iniciales de la materia de Biología, en la cual nos fue aplicado un examen en el que se nos pidió “diseñar un organismo” que pudiese vivir en un ambiente hipotético. No sé si alguien más haya sentido lo que yo en ese momento, estar en el umbral del primer escalón de una gran escalera de la que al final se haya la recompensa: el conocimiento necesario para poder diseñar un organismo (recompensa un tanto ambiciosa). El recuerdo que sigue a éste, es una frase, dada después de un pequeño monólogo sobre la investigación y el descubrimiento, que atizó la llama encendida hace tiempo en mí: la necesidad de saber. “Ser Biólogo, no es el poseer un título, ser biólogo es una forma de vida” (Camarena, 1998). Más tarde, una pregunta que tuvo por respuesta un “no sé” que significó humildad, derivó que quien impartía la clase la interrumpiera para decirme “déjame averiguar” y saliera del claustro, para volver con libro en mano y decirme: “lee, aquí está la respuesta” que significó cuan importante era yo como alumno. Volver a la escuela a las 12: AM para monitorear la cinética de crecimiento de un alga, una bacteria, o para hacer un PCR, fue una tarea dura, pero ver que un maestro está en vela a esa misma hora realizando algún raro experimento con unas cosas llamadas “anticuerpos” era reconfortante. Predicar con ejemplo, siempre será la mejor manera de hacerlo. Una clase, que vino a cambiar el concepto que tenía de un maestro, sobre su forma de razonar la cual creía yo era “caótica”, que fue llevada de manera totalmente

deductiva, en un esquema totalmente sistemático donde el caos se parecía al orden y donde las mutaciones dan lugar a nuevos géneros. La clase de estadística mezclada con moral, ética, epistemología, era mi ensalada favorita, mejor que cualquiera de la cafetería. Cuanto mejor las polémicas generadas en clase de ética por “sepan cuantos” revoltosos en la Facultad de Ingeniería, impartidas por una guapa Bióloga. Conceptos cambiados por falta de percepción, o talvez por una imagen falsa y un proceder que no dejaban más opciones sobre el estudiante que era. Y al final de ello, el regreso de la virtud y reconocimiento, agradable aunque no necesario. ¿Que decir de los cuatro fantásticos? De esas mentes indómitas que luchaban por el bien, cada quien de su perspectiva, en un ambiente rico, lleno de ideas, juicios y poderes diferentes apuntando hacia el mismo fin. El primero de ellos, el de mirada de águila, siempre sabía donde atacar, espíritu critico, de esos que se necesitan tanto en ciencia; el segundo, de mente sistemática “de ajedrecista”, que ordena la estrategia de batalla a partir de las evidencias para comenzar el ataque, definitivamente el “jefe”; el tercero, de manos ágiles, entusiastas y creativas, algo así como Macgyver con la pasión de William Wallace (¡FREEDOM!) y para cerrar con broche de oro, aquel con el poder de “confundir al enemigo”. Muy similar a la última etapa del acertijo (ver Batman eternamente). Durante mi tesis, aprendí a pertenecer a un grupo, a estar en un ambiente de trabajo agradable donde todos están dispuestos a ayudarte, del cual me instruí sobre técnicas, protocolos, reglas de laboratorio llevadas a la práctica, como sacar mayor provecho de las herramientas con las que contamos, incluso como trabajar con algunas de ellas, el ¿por qué se le dice Papá a tu director de tesis? Sólo que yo, no únicamente tenía papá, sino también mamá y un par de hermanitas cafeteras.

A mis compañeros y amigos

Biól. Mónica Castellanos Kotkoff (monquila), Cynthia Jáuregui García (tortuguita), Biól. Carolina Álvarez Delgado (Carol), Marlene Rodríguez, Claudia Patricia González Lozano (pato), Biól. Gonzalo de León Girón (chalo), Alain Gabriel Jullian Montañez (chilacas), Alejandro González Bernal (Alex), Alejandro Beltrán Aguilar (Alex), Biól. Iván Peraza Perales (che-Ñangas), Francisco Javier Ramírez Arias (pinki), Luís Ángel López Romero (tuto), Ramón Meza (raymond), María del Refugio Aldaz Velarde (cuquis), Mirella Haro Ávalos (Yeya), Biól. Ricardo Cruz López (Richie) y José Arquímedes Echánove Juan (chano).

“GRACIAS”

Como en esta parte, las verdades alternativas no son aceptadas, solo diré que han sido “los mejores compañeros del mundo” ¡ya comencé mal! Tuga, gracias por aguantarme desde la prepa, debería darte un reconocimiento por ello, eres una excelente amiga y mejor compañera, gracias por tódo, y perdón por no recordar aun tu segundo apellido, es el colmo ¿no? Monquila, que puedo decir, eres una persona a la cual admiro en todos los sentidos, como mujer, amiga, compañera, me encanta tu vida y forma de pensar, gracias por dejarme ser tu amigo. Carol, en un juego de relacionar palabras lo primero que me vendría a la mente sería café, charlas, “tripeos”, siempre fuiste como el café en el agua y algunos de los que estuvimos alrededor de ti como ella. Ahora solo queda el aroma que el agua no pudo filtrar. Chalo, Alex’s, Polo, Ñangas, Carlos, Richie, ustedes saben que aderezo hizo falta a todos esos “Jueves” de borrachera, pero no siendo

tan exigentes, no estuvieron tan mal, gracias carnales a todos, si viviéramos en otra época tal vez hubiésemos formado una bonita hermandad. Es grato saber que cada uno de nosotros destacará en su área, que algunos ya lo están haciendo, que todos tenemos grandes ambiciones, sueños y la fuerza necesaria para llevarlos a cabo. Será un orgullo poder decir después de leer una publicación: “ese es mi compa”. Chilacas, recuerdas aquel diálogo sobre teología en el que ninguno de los dos daba su brazo a torcer, ¡reconócelo ya! ¡Confiesa quien es tu mentor! Se que nuestra amistad no terminará aquí, tenemos muchas cosas aun por hacer en este mundo de “gente normal”. Chano, gracias por los cotorreos tan fumados que tuvimos. Cuquis, gracias por las galletas, los cafés, las pepto, las aspirinas, los pasteles, de verdad gracias por hacer de la escuela nuestra segunda casa. Yeya, gracias por ayudarme en tantas cosas y por haber compartido tantas otras, entre ellas tiempo, el cual fue muy agradable. Pinki, no sé porque darte las gracias, eso es lo que pasa cuando tienes tanto tiempo cerca de una persona, cuando ya la consideras de tu familia. Raymond y Tuto (saludos al gallo), los últimos dos de los cuatro fantásticos (del voli), gracias por complementar el grupo, por ser no solo compañeros, sino amigos de los mejores. Gracias a todas las personas que hicieron de mi vida académica, una vida más agradable.

RESUMEN

Tesis de **RICARDO VALENCIA YAÑEZ** presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en **BIOLOGÍA**. Ensenada, Baja California, México. Diciembre de 2004.

“ESTUDIO GENÓMICO DE LOS AISLADOS GEOGRÁFICOS DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA”

Resumen aprobado:



Dr. Jorge de la Rosa Vélez

“El WSSV” (por sus siglas en inglés *White Spot Syndrome Virus*), es el agente causal de la enfermedad conocida como “síndrome de la mancha blanca”. En 1993, causó en China la pérdida del 70% del producto total de camarón; después de este evento, la enfermedad se extendió hacia Japón, Taipei y el resto de Asia. En 1999, se reportó su presencia en el continente americano, incluyendo México, en granjas de cultivo en Sonora y Sinaloa. A la fecha, han sido reportadas cuatro secuencias completas de su genoma, reconocidas como “aislados geográficos o cepas” WSSV-Th para la cepa de Tailandia, WSSV-Ch la de China, WSSV-Tw la de Taiwán y otra cepa aun no reconocida como aislado geográfico particular de 305,107 pb; asimismo, diferencias en los grados de morbilidad entre aislados, además diferencias sutiles en secuencias de genes involucrados en el proceso infeccioso. El objetivo de este trabajo fue determinar si existen diferencias en las secuencias de los genes que codifican para las proteínas mayores del WSSV, en comparación con las secuencias ya publicadas. Para esto, fueron diseñados iniciadores específicos para los genes estructurales VP28, VP19, VP26, VP24 y VP15 y los tempranos RR (ribonucleótido reductasa) y PK (proteína cinasa), con los cuales se obtuvieron ocho productos de PCR que fueron secuenciados y analizados con las secuencias disponibles en “Gen Bank”. Las secuencias de los genes VP15, VP26, VP28 y RR2 de la cepa mexicana son idénticas con respecto a sus homólogas de China, Tailandia y Taiwán. Una mutación de una guanina por una adenina en la posición 252 del gen VP24 de la cepa de Taiwán, la hace diferenciable de las de China, México y Tailandia. En cuanto a la secuencia del gen VP19, las cepas de México y Taiwán son idénticas, presentan una mutación de una adenina por una timina en la posición 193 que las distingue de los aislados de China y Tailandia. La cepa de China por su parte, posee una transición de timina por citosina en la posición 171 del ORF-2801 que no la contienen el resto de los aislados. Las mutaciones que presentan los genes VP19 y VP24, permiten distinguir entre las cepas de México, China, Tailandia y Taiwán. Asimismo sugieren que cepa presente en México proviene de la de Taiwán.

Palabras clave: WSSV, WSD, virus del síndrome de la mancha blanca, camaronicultura, aislados geográficos, variación genética.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	5
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS PARTICULARES.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
DISEÑO Y SELECCIÓN DE INICIADORES.....	11
OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	12
EXTRACCIÓN DE ADN.....	13
REVELADO.....	13
CONFIRMACIÓN DE INFECCIÓN POR WSSV EN EL MATERIAL UTILIZADO.....	13
AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS ESPECÍFICOS.....	14
PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.....	15
SECUENCIACIÓN.....	15
DEPURACIÓN DE SECUENCIAS.....	15
ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	17
RESULTADOS.....	20
EXTRACCIÓN DE ADN.....	20
CONFIRMACIÓN DE LA INFECCIÓN CON WSSV EN EL MATERIAL UTILIZADO.....	22
AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS ESPECÍFICOS.....	24
Producto de los genes VP15, VP19 y VP24.....	24
Productos de los genes VP26 y VP28.....	25
Producto del gen RR2.....	27
Producto de los genes RR1 y PK1.....	28
PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.....	29
SECUENCIAS OBTENIDAS.....	31
ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	33
Resultado del blast.....	33

Variaciones nucleotídicas.....	40
Variaciones de la secuencia de aminoácidos entre aislados por gen.....	41
ANÁLISIS A PARTIR DE SECUENCIAS.....	42
Distancia genética: índice Jukes-Cantor (JC) y árboles Neighbor-Joining (NJ).....	42
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	52
RECOMENDACIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	54
ANEXO.....	60
1. FIGURAS.....	60
2. PROTOCOLOS.....	63
3. MATERIALES, REACTIVOS Y CONDICIONES DE PCR.....	66
4. SECUENCIAS OBTENIDAS.....	69
5. ÍNDICES DE DISTANCIA GENÉTICA.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Cromatograma del producto del gen VP19.....	16
FIGURA 2. Alineamiento de secuencias obtenidas mediante el BLAST de la secuencia del gen VP28 reportada en este estudio, en el software ClustalX (1.81).....	18
FIGURA 3. Electroforesis 1. Productos de extracción de ADN total con el método de sales.....	20
FIGURA 4. Electroforesis 2. Productos de extracción de ADN total con el método de sales.....	21
FIGURA 5. Electroforesis de productos de PCR como prueba de presencia del WSSV en muestras (productos de PCR de un segmento del gen VP28).....	23
FIGURA 6. Electroforesis de los productos de amplificación de los genes VP15, VP19 y VP24, en un intervalo de temperatura de 46.8 a 70 °C.....	25
FIGURA 7. Electroforesis de los productos de PCR de los genes VP28 y VP26.....	26
FIGURA 8. Electroforesis de los productos de PCR del fragmento del gen RR2 en un intervalo de temperatura de 75 a 50 °C.....	27
FIGURA 9. Electroforesis de los productos de PCR de los genes RR1 y PK1. En un intervalo de temperatura de 75 a 71.3 °C.....	29
FIGURA 10. Electroforesis que muestra los productos de la PCR purificados.....	30
FIGURA 11. Electroforesis de productos de PCR purificados. Segundo lavado del cartucho de recuperación del paquete de purificación.....	30
FIGURA 12. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen VP15.....	43
FIGURA 13. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen VP19.....	44

FIGURA 14. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen VP24.....	45
FIGURA 15. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen VP26.....	46
FIGURA 16. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen VP28.....	47
FIGURA 17. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen RR2.....	48
FIGURA 18. Micrografía electrónica del WSSV que muestra la morfología general del virus.....	60
FIGURA 19. Micrografía electrónica de la nucleocápside del WSSV.....	60
FIGURA 20. Esquema representativo de la morfología general del virión y relación de proteínas mayores asociadas a envoltura y nucleocápside del WSSV.....	61
FIGURA 21. Juvenil de <i>Litopenaeus vannamei</i> con marchas blancas características de la enfermedad de la mancha blanca (WSD).....	61
FIGURA 22. Cubierta quitinosa de un juvenil de <i>Litopenaeus vannamei</i> con “manchas blancas”, característica patológica de la enfermedad causada por el WSSV.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. Tipos de muestras utilizadas.....	12
TABLA II. Características de las secuencias “consenso” de la cepa mexicana. Acceso a “Gen Bank”, longitudes, codones de inicio y relación de bases.....	32
TABLA III. Características de las secuencias no ensambladas de los iniciadores “F” y “R” de la cepa mexicana. Gen, longitud y relación de bases.....	33
TABLA IV. Resultados del BLAST de la secuencia del gen VP15.....	34
TABLA V. Resultados del BLAST de la secuencia del gen VP19.....	35
TABLA VI. Resultados del BLAST de la secuencia del gen VP24.....	36
TABLA VII. Resultados del BLAST de la secuencia del gen VP26.....	37
TABLA VIII. Resultados del BLAST de la secuencia consenso del gen VP28.....	38
TABLA IX. Resultados del BLAST de la secuencia del gen RR2.....	39
TABLA X. Variaciones nucleotídicas entre secuencias.....	40
TABLA XI. Variaciones de aminoácidos en las secuencias putativas de proteínas entre aislados geográficos.....	41
TABLA XII. Secuencias, longitud, temperaturas de alineamiento, fragmentos esperados y designaciones de los iniciadores diseñados.....	66
TABLA XIII. Tratamientos usados para la estandarización de la reacción de PCR con los iniciadores de Vega 2003.....	67
TABLA XIV. Relación de tratamientos en las reacciones de PCR para confirmar la presencia de WSSV en las muestras.....	67
TABLA XV. Mezcla maestra para reacciones de PCR.....	67
TABLA XVI. Condiciones de la PCR en el termociclador, para la amplificación de los fragmentos deseados.....	68
TABLA XVII. Gradientes de temperatura para la etapa de alineamiento de la PCR, en °C.....	68
TABLA XVIII. Secuencia amplificada del gen VP15.....	69
TABLA XIX. Secuencia amplificada del gen VP19.....	69
TABLA XX. Secuencia amplificada del gen VP24.....	69

TABLA XXI. Secuencia amplificada del gen VP26.	70
TABLA XXII. Secuencia del gen VP28, obtenida con los iniciadores de la tabla XII. ..	71
TABLA XXIII. Secuencia del gen VP28, obtenida mediante la utilización de los iniciadores de Vega (2003).	71
TABLA XXIV. Secuencia completa del gen VP28 y una región de 44 bases del gen PK.	72
TABLA XXV. Secuencia que se obtuvo del gen RR2.	73
TABLA XXVI. Secuencia amplificada del segmento del gen RR1 con el iniciador “F”.	74
TABLA XXVII. Secuencia amplificada del segmento del gen RR1 con el iniciador “R”, presentada en sentido “río arriba”.....	75
TABLA XXVIII. Secuencia amplificada del segmento del gen PK1 con el iniciador “F”.	76
TABLA XXIX. Secuencia amplificada del segmento del gen PK1 con el iniciador “R”.	77
TABLA XXX. Matriz de distancia genética entre aislados, gen VP15: índice de distancia Jukes-Cantor.	77
TABLA XXXI. Matriz de distancia genética entre aislados, gen VP19: índice de distancia genética Jukes-Cantor.	79
TABLA XXXII. Matriz de distancia genética entre aislados, gen VP24: índice de distancia genética Jukes-Cantor.	79
TABLA XXXIII. Matriz de distancia genética entre aislados, gen VP26: índice de distancia genética Jukes-Cantor.	80
TABLA XXXIV. Matriz de distancia genética entre aislados, gen VP28: índice de distancia genética Jukes-Cantor.	81
TABLA XXXV. Matriz de distancia genética entre aislados, gen RR2: índice de distancia genética Jukes-Cantor.	81

INTRODUCCIÓN

El “WSSV” por sus siglas en inglés (*white spot syndrome virus*) es el agente causal del síndrome conocido como “enfermedad de la mancha blanca, WSD” (White Spot Disease). Dicha enfermedad fue responsable en la década de los noventa, de pérdidas multimillonarias en granjas camaroneras de Filipinas, Tailandia, Japón, China y otros países asiáticos. Los primeros brotes se produjeron en 1993 en la República Popular de China y resultaron en la pérdida del 70% de la producción total de camarón. A partir de este evento, la enfermedad de la mancha blanca se propagó hacia Japón, Taipei y el resto de Asia. A principios de 1999, se reportó en el sur de Estados Unidos, América Central y Sudamérica. En Panamá, el nivel de sobrevivencia fue del 5% de 9 mil hectáreas de terrenos utilizados para cultivo. La presencia del WSSV en México, data de 1999 (identificado con base en técnicas histológicas por Mijangos y Castro en 2003), en granjas de Sonora y Sinaloa; sin embargo, hasta el 2002 fue confirmada su presencia por de la Rosa y Bonami, con base en técnicas moleculares.

El WSSV puede afectar a crustáceos y es altamente infeccioso para la mayoría de los camarones peneidos, entre ellos: el camarón tigre negro (*Penaeus monodon*), kuruma ebi (*P. japonicus*), camarón chino (*P. chinensis*), camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), camarón de la India (*P. indicus*) y al camarón banana (*P. merguensis*). Además, se ha detectado en especies de crustáceos decápodos (cangrejos de mar y de río, langostinos, langostas, entre otros). Las fuentes de contagio a partir de camarones infectados aún no han sido establecidas, sin embargo, la cohabitación entre

camarones sanos e infectados puede producir el desarrollo de la enfermedad en un tiempo aproximado de 36 a 48 horas (Mijangos y Castro, 2003).

La sintomatología consiste en la disminución o cese completo en el consumo de alimento, incremento en la tasa de mortandad, adquisición de una coloración rojiza y la presencia de “manchas blancas” de varios milímetros de diámetro (anexo 1, figuras 21 y 22) en la superficie del exoesqueleto. Los camarones en estado letárgico o moribundo flotan en la superficie de los estanques, o nadan lenta y erráticamente. A nivel histológico presentan cromatina marginada, hipertrofia celular e inclusiones intranucleares en varias fases del desarrollo. Una vez presentes los síntomas, puede alcanzarse una mortandad de hasta el 100% entre 3 y 7 días. Actualmente, no existe ningún tratamiento para la enfermedad causada por este virus. Los brotes pueden producirse en cualquier época del año y en todas las fases de cría, aunque ciertas fluctuaciones drásticas ambientales los favorecen (Mijangos y Castro, 2003).

Actualmente, el WSSV es considerado como el patógeno más importante de la industria camaronea a nivel mundial (Hew *et al*, 2003).

El WSSV, es un virus de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 305,000 pb, que varía en cuanto a su longitud, dependiendo del aislado geográfico al cual pertenece. Contiene 181 presuntivos ORF'S (open reading frames) y nueve regiones con 47 mini-fragmentos repetidos y repeticiones atípicas de secuencias invertidas, también llamadas “palíndromos imperfectos” (Yang *et al*, 2001; Van Hulten

et al, 2002; Vlák *et al*, 2002). La envoltura presenta un apéndice filamentoso de localización apical (ver anexo 1, figura 18), el virión es de forma bacilar a elíptica de 275 nanómetros (nm) de longitud por 120 nm de ancho, la nucleocápside mide alrededor de 300 x 70 nm, caracterizada por encontrarse abierta en un extremo (anexo 1, figura 19). Está compuesta por cinco proteínas mayores y un número desconocido de polipéptidos menores. Las proteínas estructurales de 28 KDa. (VP28) y 19 KDa. (VP19) se ubican en la envoltura viral, mientras que las proteínas de 15 KDa. (VP15), 24 KDa. (VP24) y 26 KDa. (VP26) en la nucleocápside (anexo 1, figura 20); a este grupo también se le conoce comúnmente como “proteínas tardías” (Van Hulten *et al*, 2002). Por otro lado, durante el desarrollo de la infección, se sintetizan proteínas tempranas; entre las más importantes se encuentra la ribonucleótido reductasa (RR) EC¹ 1.17.4.-² y la proteína cinasa (PK) EC 2.7.1.-. Las propiedades de las “RRs” (Ribonucleótido Reductasas) varían de una especie a otra, pero las evidencias sugieren que comparten mecanismos de acción, y parecen haber evolucionado a partir de una enzima primigenia común. Son responsables de la reducción de los cuatro ribonucleótidos, por lo cual son de gran importancia para la síntesis de ADN (Stryer *et al*, 2003). Están compuestas por dos subunidades: la primera, denominada subunidad larga “RR1” y la segunda, conocida como subunidad corta “RR2” (Van Hulten *et al*, 2002). Por su parte, las proteínas cinasas fosforilan otras enzimas. Se componen de una unidad reguladora y otra

¹ Enzyme Commission.

² El último número de clasificación indica el sustrato que reconoce este grupo de enzimas: 1 actúa sobre ribonucleótidos difosfatados y 2 sobre ribonucleótidos trifosfatados.

catalítica, “utilizan ATP para fosforilar a las formas carentes de fósforo” (White *et al*, 1983).

El virus de la mancha blanca, pertenece a la familia Nimaviridae (00.103), del género Whispovirus (0.01), siendo la única especie (.001) de este género, según: la base de datos universal del comité internacional de taxonomía de virus “ICTV” (Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses).

ANTECEDENTES

Por medio de microscopía electrónica se determinó, con base en la comparación morfológico-métrica del virión y la nucleocápside, que no existen diferencias significativas entre aislados de China, India, Tailandia, EUA (Sur de Carolina), EUA (Texas) obtenidos de camarones peneidos y un aislado de EUA (Zoológico de Washington) del acocil (*Procambarus* sp, cangrejo de agua dulce de Louisiana). Asimismo, mediante SDS-PAGE, se estableció que los seis aislados son altamente similares, pero no idénticos, ya que todos poseen los polipéptidos de ~25, 23 y 19 kDa. Sin embargo, el polipéptido de 14.5 kDa, sólo cuatro lo presentan. El aislado del acocil es diferente de los demás en el perfil estructural de la proteína de 19 kDa (Wang *et al*, 2000).

Mohan *et al*, (1998) dividen la manifestación clínica de la infección en tres tipos: el primero (agudo a sub-agudo), típico en juveniles, caracterizado por exhibir manchas blancas en la cutícula y mortandad entre los días 7 y 10. El segundo (crítico), presenta un marcado enrojecimiento y tejido altamente afectado. La tasa de mortandad más alta se alcanza en 2 ó 3 días. El tercero (crónico), no presenta manchas blancas ni enrojecimiento. El tejido muestra un bajo nivel de infección, alcanzado la tasa de mortandad más alta entre 15 y 18 días. Los dos últimos tipos son comunes en sub-adultos y adultos.

En 1998, se realizaron infecciones experimentales con el fin de establecer si existen diferencias en la mortandad provocada por seis aislados geográficos distintos,

provenientes de China, India, Tailandia, Texas y Carolina del Sur a partir de camarones peneidos y uno de acocil (*Cambarellus zempoalensis*), proveniente del zoológico nacional de EUA (Washington). Todos causaron la muerte del 100% de los especímenes utilizados de *L. vannamei* del estadio post-larval. En contraste, la mortalidad en juveniles de camarón rosado (*Farfantepenaeus duorarum*) fue sólo de 35 a 60%, con variaciones entre aislados, el efecto letal del aislado de Texas fue más rápido, mientras que el del virus aislado de acocil provocó la muerte más lentamente; el de Washington por su parte, resultó ser el menos letal (Wang *et al*, 1998).

Existen evidencias relacionadas con la presencia elevada de carga viral en varias especies de cangrejos nativos de Asia que sugieren la reducción del efecto letal de su infección (Kanchanaphum *et al*, 1998; Supamattaya *et al*, 1998).

Desde el primer brote, en la República Popular de China en 1993, se han reportado secuencias parciales del WSSV de algunos genes involucrados en el proceso infeccioso, como los que codifican para las proteínas de la envoltura. Fue hasta los meses de julio y noviembre de 2001 que se publicó el genoma completo del WSSV, el cual consta de 292,967 pb (WSSV-Th) y 305,107 pb (WSSV-Ch). En 2002, Tsai *et al* publicaron otra secuencia de 307,287 pb (WSSV-Tw). Con la última secuencia completa del WSSV (Van Hulten *et al*, 2004), se suman cuatro genomas secuenciados de aislados geográficos diferentes disponibles en "Gen Bank".

Wang *et al* (2000) mediante análisis con RFLP (por sus siglas en inglés: “restriction fragments length polimorfism”) e hibridación Southern blot, determinaron que no existe variación genética entre los aislados de China (hospedero: *Penaeus chinensis*), India (*P. monodon*), Tailandia (*P. monodon*), Texas³ (*P. setiferus*), y Carolina del Sur (*P. setiferus*). Sin embargo, permitió discriminar del resto un sexto aislado de Washington (*Orconectes punctimanus*). Asimismo, utilizando RFLP (con la endonucleasa *Hind* III), Nadala y Loh (1998), pudieron diferenciar entre los aislados geográficos de China (*P. japonicus*), Tailandia (*P. monodon*) y EUA (*P. setiferus*).

En otros estudios con aislados de China, Tailandia y Taiwán, se determinó que existe un alto grado de variación en el número de repeticiones en tándem del ORF94, siendo 8 el más común, con oscilaciones de 6 a 20. Además, una variación constante en la posición 36 de T por G. Por otro lado, el WSSV-Tw contiene 6 repeticiones del ORF 234; asimismo, la cepa de China (WSSV-Ch) presenta 12 copias del ORF 178 (Lo *et al*, 1999; Wang *et al*, 2000 y Wongteerasupaya *et al*, 2003).

Moon *et al* (2003) al analizar las secuencias de los genes VP24, VP26 y VP28 de una cepa coreana con sus homólogas de Taiwán, Tailandia y China, establecieron los siguientes porcentajes de identidad: 100, 100 y 99% respectivamente. Estos mismos autores sugieren que, mediante este tipo de estudios, es posible esbozar análisis filogeográficos, con el fin de determinar la región a partir de la cual están siendo introducidos los agentes virales.

³ En el golfo de México

Chang *et al* (2001) encontraron una mutación en la secuencia del gen RR1 en un aislado de camarón azul (*Callinectes sapidus*) de New Jersey, EUA en la posición 1,661. Esta mutación sinónima, de citosina (C) por timina (T) genera un cambio en el patrón de corte con la enzima *Rsa*I. Esta sustitución, resulta en una variación en la secuencia putativa de aminoácidos de una alanina (A) por una valina (V). De su amplificación por medio de AFLP, se logró obtener un producto de 1,156 pares de bases. Esta mutación distinguió el aislado de New Jersey, de los de New York, Texas y del aislado de Taiwán.

HIPÓTESIS

❖ Existen diferencias en la secuencia de genes selectos en la cepa del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en cultivos de *Litopenaeus vannamei* que infecta camarones de cultivo en granjas mexicanas, respecto a las cepas de otros aislados geográficos.

OBJETIVO GENERAL

❖ Determinar si existe variación genética del virus del síndrome de la mancha blanca WSSV-Mx (cepa mexicana) en los genes VP15, VP19, VP24, VP26, VP28, RR (ribonucleótido reductasa) y PK1 (proteína cinasa, subunidad corta), con respecto a otros aislados geográficos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener iniciadores específicos para amplificar las secuencias de los genes VP15, VP19, VP24, VP26, VP28, VP29, RR y PK.
2. Establecer las condiciones de PCR particulares para los iniciadores diseñados mencionados en el punto anterior para amplificar los fragmentos de los genes deseados.
3. Determinar las secuencias de bases de los fragmentos amplificados.
4. Detectar los cambios en las secuencias de los productos de PCR respecto a las secuencias reportadas en "Gen Bank".
5. Calcular las distancias genéticas entre aislados por gen.
6. Elaborar un árbol filogenético por gen.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO Y SELECCIÓN DE INICIADORES

Se llevó a cabo mediante el software FAST PCR (3.0), en regiones conservadas que flanquean posibles regiones variables de cada gen elegido, según las secuencias publicadas en “Gen Bank” de los genes VP (15, 19, 24, 26 y 28), RR y PK (subunidad 1). El programa genera entre 50 y 100 pares de iniciadores (par: 1 sentido “río arriba” y 1 antisentido), además una serie de cebadores individuales de un número dependiente de la longitud del fragmento de ADN a partir del cual son generados. Cada par de iniciadores presenta dos características exclusivas de su combinación.

1. Longitud del producto de PCR esperado.
2. Temperatura de alineamiento.

Individualmente el iniciador cuenta con temperatura de alineamiento, porcentaje de “G y C” y calidad o eficiencia. El criterio de selección fue: si existe una combinación, que como producto esperado, resulte en el 80% (+/- 5%) de la longitud de la secuencia a partir de la cual se diseñó, se toma el par de iniciadores que comparta la máxima homología con respecto a la eficiencia de los cebadores individuales. Por ejemplo, el iniciador sentido “F” (del inglés Forward) tiene una eficiencia del 82% y el antisentido “R” (del inglés Reverse) posee una eficiencia del 80%, el producto esperado de su combinación es de 291 bases a partir de un templete de 320 bases. Este par se rige bajo el criterio antes establecido, por lo cual es un candidato óptimo para los fines mencionados en los objetivos. En el caso de no encontrar ninguna combinación que cumpla con estas características se forma un par a partir de los cebadores individuales

que tengan, en primer término la temperatura de alineamiento más cercana ($<0.8^{\circ}\text{C}$); como segundo término, que el producto cumpla con el criterio establecido para los cebadores “en par”; en tercer término, que sus eficiencias individuales no difieran más del 9% y por último, que el porcentaje del contenido de “G y C” esté arriba del 55%. Los iniciadores de los genes VP (15, 19, 24, 26, 28,) PK1, RR1 y RR2 fueron sintetizados en la empresa comercial “Invitrogen”. Las secuencias de los cebadores y sus características están descritas en el anexo 3, tabla XII.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de camarón infectado fueron donadas por la Universidad de Sonora, se conservaron en nitrógeno líquido, dichas muestras provienen de una infección experimental realizada a partir de un camarón muerto por WSSV (F0). La infección se llevó a cabo en dos etapas; en la primera, fue infectado un lote de “n” camarones (F1), al alcanzar un 100% de mortandad se tomó un ejemplar e infectó al siguiente lote, al cual se le denominó “F2”.

TABLA I. Tipos de muestras utilizadas.

Denominación	Características de la muestra
F0	Camarón macerado + hemolinfa
F1	Camarón entero preservado en congelación a -80°C
F2	Camarón entero preservado en congelación a -80°C

EXTRACCIÓN DE ADN

Se extrajo ADN total, a partir de las muestras descritas, por el método de precipitación por sales (Alijanabi-Martínez, 1997), modificado por Enríquez (comunicación personal)⁴. Fueron utilizados 70 mg de tejido. Cada producto obtenido de la extracción se resuspendió en 50 μ L de TE (Tris-HCl y EDTA), precalentado a 65 0C y fueron conservados a -20 0C para su uso posterior (anexo 2, protocolo de extracción).

REVELADO

Los productos fueron revelados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio al 0.1%. Las electroforesis fueron realizadas en tiempos desde 25 minutos hasta 1.5 h, según el tamaño presuntivo de los productos esperados, a 5 voltios/cm y visualizados en una cámara de luz ultravioleta, SIGMA T-1202. Las imágenes de los revelados, se tomaron con un equipo fotográfico digital, KODAC DC290 con lente de 38-115 mm.

CONFIRMACIÓN DE INFECCIÓN POR WSSV EN EL MATERIAL UTILIZADO

La confirmación de la infección se realizó por medio de PCR usando los iniciadores diseñados por Vega (2003) para el fragmento del gen VP28, en un termociclador iCycler (BIORAD). Como template se usaron los productos de ADN total obtenidos de las extracciones correspondientes. De la reacción se obtuvo un producto de 461 pb (Vega, 2003). Como testigo negativo se utilizó ADN genómico de camarón no infectado.

⁴ L.M. Enríquez. Laboratorio de Ecología Molecular. Facultad de Ciencias Marinas, UABC

Para estandarizar la reacción se utilizaron tres variables:

1. Concentración de ADN
2. Concentración de cloruro de magnesio
3. Temperatura de alineamiento

Las variables fueron combinadas en 12 tratamientos (anexo 3, tabla XIII). Se probaron tres temperaturas de alineamiento (49, 50 y 51 °C) en una reacción compuesta de tres etapas, estructurada de la siguiente manera: una desnaturalización de inicial a 95 °C por 1 minuto, una desnaturalización al empezar cada ciclo a 95 °C durante 50 segundos, alineamiento de iniciadores a las tres temperaturas descritas arriba y una extensión de 1 minuto a 72 °C que finaliza cada ciclo, de un total de 30 que concluyen con siete minutos de elongación a 72 °C.

AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS ESPECÍFICOS

Se llevó a cabo bajo las condiciones de reacción descritas en las tablas XV y XVI. La tabla XV muestra los reactivos utilizados y la concentración en la mezcla de reacción, en un volumen final de 25 µL. El ADN usado como template, se tomó la dilución 1:10 de los productos obtenidos de las extracciones de ADN correspondientes. En la tabla XVI, están especificadas las condiciones utilizadas en el termociclador y tiempos utilizados para establecer la temperatura óptima de alineamiento (T_m), para los iniciadores diseñados. Los gradientes de temperatura están descritos en la tabla XVII. En el caso de los genes PKI y RRI, el intervalo de temperatura es más estrecho que para el resto de los genes. Esto se debe a que fuera de ese intervalo de temperatura los iniciadores son inespecíficos. Por otro lado, en el perfil de reacción de estos genes fue

incluida una fase adicional, con respecto al resto de las reacciones, con el fin de obtener una mayor cantidad de producto y eliminar la posible unión inespecífica del iniciador.

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

El ADN se purificó a partir de un volumen total de 100 μ L de los productos de PCR de mejor calidad para los genes VP (15, 19, 24, 26 y 28), RR, PK subunidad 1, mediante el paquete: “CONCERT RAPID PCR PURIFICATION SYSTEM™” (Life Technologies) bajo el protocolo de purificación descrito en el anexo 2. De dichos productos, se estimó la concentración de ADN visualmente en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio al 0.1%, en una sesión de 1.5 horas a 80 voltios/cm.

SECUENCIACIÓN

- ❖ Fue realizada por la empresa “Sequegene Inc.”, en San Diego, California EUA.

Se enviaron muestras en tubos de 1.5 μ L con 0.64 μ L de cada iniciador (10 mM) para cada fragmento (F y R), mas el ADN (molde) en una proporción de 25 ng por cada 100 pb de longitud del producto teórico esperado, para un volumen final de 12 μ L aforados con agua desionizada y estéril (H₂O_{dde}).

DEPURACIÓN DE SECUENCIAS

En el programa “Chromas Pro (versión 1.14)” se integró la información obtenida del iniciador “F” con la generada del iniciador “R” de cada gen mediante el análisis de sus cromatogramas y se depuraron las secuencias. Por ejemplo: en la figura 1, está

representada una sección de los cromatogramas del gen VP19, el de la parte superior se obtuvo del iniciador "F", y el de la inferior del iniciador "R". La parte del iniciador "F" representada en la figura, es la región adyacente al cebador. En ella, puede observarse que no están bien definidos las crestas que representan las bases, sin embargo, en la región terminal del producto que se obtuvo del cebador "R" las crestas son muy claras, por lo tanto para determinar la secuencia de este fragmento, fue utilizada la información generada del cebador "R". De esta manera fue analizado el resto de esta secuencia y las de los genes restantes, tomando la información de los cromatogramas de ambas, para generar una secuencia consenso a partir de estas.

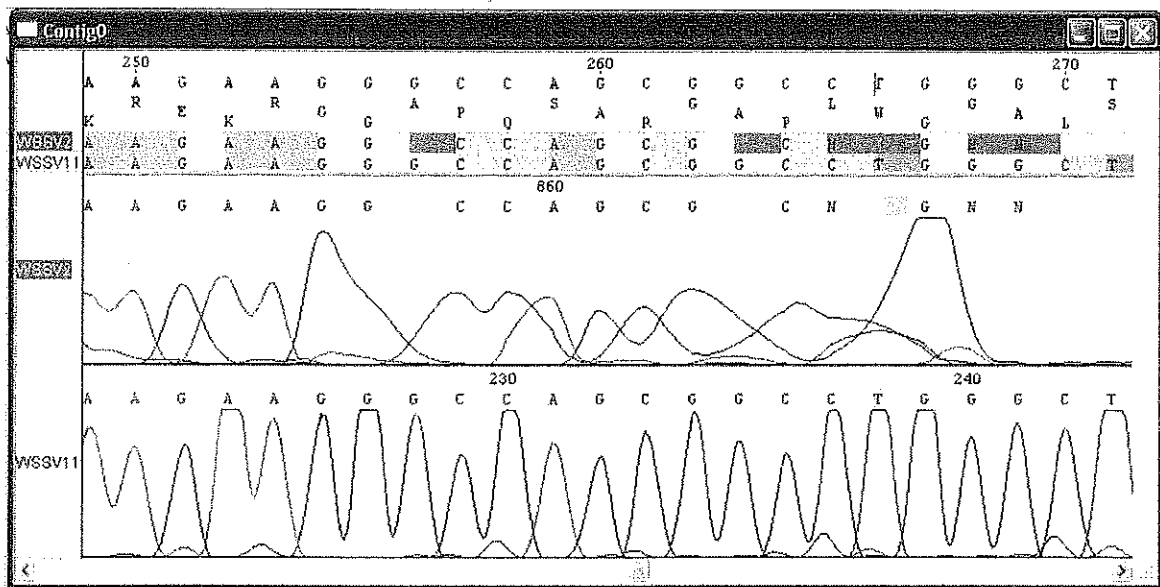


FIGURA 1. Cromatograma del producto del gen VP19. Sobre la línea el obtenido del cebador "F" (región distal de la secuencia) y bajo ella del iniciador "R".

ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Una vez depuradas, procedió un alineamiento de las secuencias obtenidas con las depositadas en “Gen Bank” por el método de “BLAST” (por sus siglas en inglés: “Basic local alignment search tool” (Altschul *et al*, 1990)), con el objetivo de encontrar las secuencias afines para el posterior análisis. Del “BLAST” se obtienen, en primer orden las secuencias con mayor número de identidades, hasta llegar a las de menor número. Este hecho implica que existan secuencias con distintos números de loci analizables, como puede observarse en la figura 2, donde no existen sino hasta alrededor de la base 140, a partir de la cual (en la región presentada en la figura) existe un 100% de homología entre secuencias. En contraparte, de la base 110 a la 139 hay varios sitios que no tienen homólogo en todas las secuencias (los cuales están indicados con un guión). En la columna de números de la izquierda se muestran de mayor a menor la homología que existe entre las secuencias, numeradas en orden ascendente. La siguiente indica el número de alineamiento del BLAST que corresponde a cada secuencia particular. Cada asterísco indica “1 locus” monomórfico, mientras que la ausencia de el, indica polimorfismo o falta del sitio homólogo para su evaluación. La línea sombreada en gris (ruler) indica la posición de cada base.

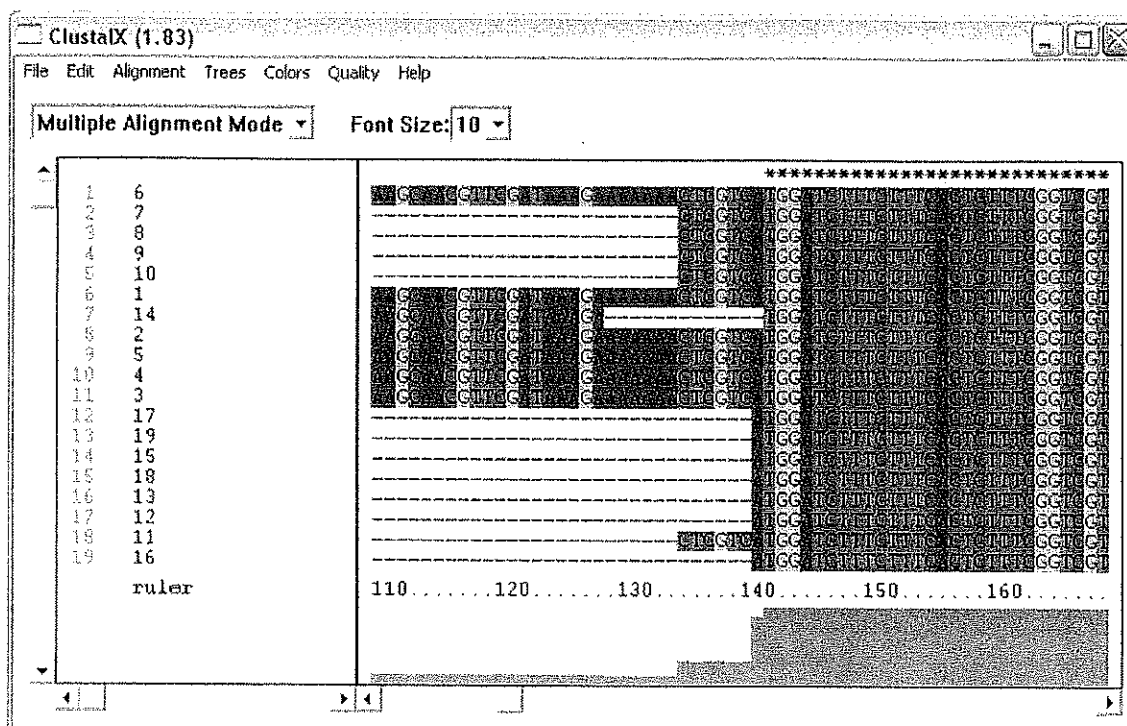


FIGURA 2. Alineamiento de secuencias obtenidas mediante el BLAST de la secuencia del gen VP28 reportada en este estudio en el software ClustalX(1.81).

Por lo anterior, para el análisis de secuencias sólo fueron utilizados los loci que contaron con homólogos en todas las secuencias.

Las secuencias consenso que se obtuvieron se analizaron en dos sentidos:

1. A partir de las secuencias que se obtuvieron del BLAST y las generadas en este trabajo, mediante su alineamiento y análisis se calcularon los índices de distancia genética entre secuencias con el fin de establecer un valor numérico a las diferencias existentes o no, entre las secuencias analizadas. Este punto fue realizado con el programa "MEGA 2.1" (Kumar *et al*, 2001) en la modalidad distancia genética por el método de "Jukes-Cantor", ya que con él es posible establecer diferencias numéricas entre secuencias con una fineza mínima de una base.

2. A partir de los índices de distancia genética calculados se establecieron grupos discretos en un árbol filogenético para cada gen, por el método del vecino más cercano “NJ” (del inglés: Neighbor-Joining, NJ Saitou y Nei 1987), basados en el índice de distancia Jukes-Cantor (JC).

El computo de índices y la generación de fenogramas fueron realizados en el programa “MEGA 2.1” (Kumar *et al*, 2001). El fin de crear agrupaciones, es observar cuáles son los posibles patrones que generan la estructura de cada árbol.

RESULTADOS

EXTRACCIÓN DE ADN

De las extracciones con el método de sales, se obtuvo ADN de camarón infectado de la mezcla “músculo y hemolinfa” (F0, figura 3, carril 1), no se distingue ningún producto, sin embargo como se confirmará más adelante en las reacciones de PCR donde será utilizado como templete, sí se logro extraer ADN de la muestra. Asimismo, de músculo de camarón sano se obtuvieron tres productos: dos bandas claras de ADN de alto peso molecular, indicadas con la flecha de la parte superior (carriles 3 y 4) y una banda difusa a la altura de las otras (carril 2). El origen de siembra está indicado con la flecha de la parte inferior.

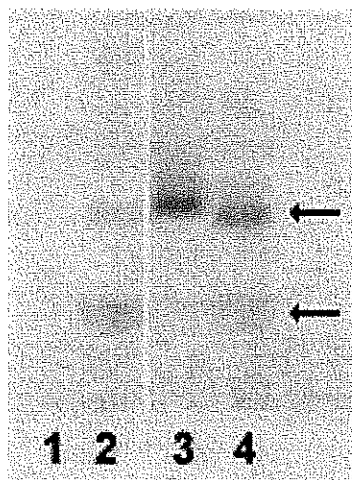


FIGURA 3. Electroforesis 1. Productos de extracción de ADN total con el método de sales. La muestra de la línea 1 (mezcla de músculo y hemolinfa) es producto de camarón infectado, las líneas 2-4 son de camarón sano. La flecha de la parte superior indica bandas de ADN de alto peso molecular y la inferior el origen de siembra. Concentraciones aproximadas de ADN en el orden de la imagen son: <120, 130, 350 y 250 ng.

Se realizó una extracción adicional para tener un mayor stock de ADN para las reacciones de PCR. De esta, se obtuvo una banda de ADN genómico de camarón infectado, indicado con la segunda flecha (figura 4, carril 1); los carriles del 2 al 4 corresponden a ADN de camarón sano al igual que la muestra del carril; las de los carriles 3 y 4 provienen de camarón fresco de cultivo donado por la Facultad de Ciencias Marinas (UABC), que al igual que la muestra del carril 1, presenta bandas de ADN de alto peso molecular

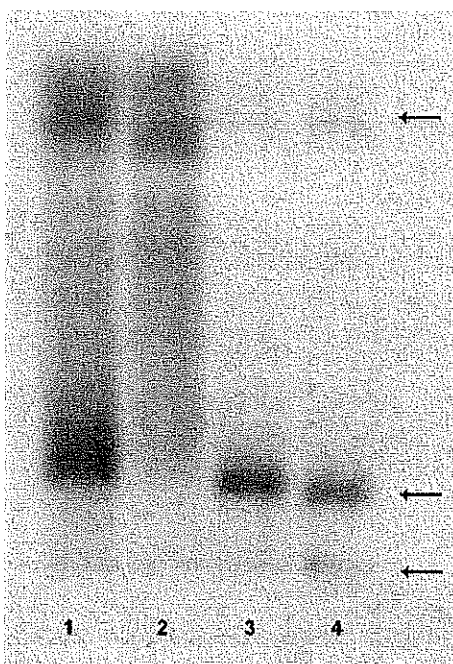


FIGURA 4. Electroforesis 2. Productos de extracción de ADN total con el método de sales. La muestra del carril 1, es producto de camarón infectado, las de los carriles 2-4 son de camarón sano. La flecha de la parte inferior muestra el origen de siembra; la de la parte media, ADN de alto peso molecular y la de la parte superior, una banda probablemente de ARN o ADN en un estado de degradación avanzado. Los barridos de las muestras de los carriles 1 y 2 también muestran un halo de ácidos nucleicos degradados. Concentraciones aproximadas de ADN en el orden de la imagen: 350, 150, 350 y 250 ng.

CONFIRMACIÓN DE LA INFECCIÓN CON WSSV EN EL MATERIAL UTILIZADO

La prueba resultó positiva en las muestras de los carriles 10-12 y 15 (figura 5), se obtuvo un producto (en forma de una banda nítida) a la altura del fragmento de 560 pb. En las muestras correspondientes a los carriles 10-12 se utilizó ADN (F2, dilución 1:10) de la extracción 2, la del carril 15, ADN de la extracción 1(F0, dilución 1:10). La concentración de cloruro de magnesio para todas estas muestras fue mantenida en 1.55 mM.

En los carriles 4-9 y 14 se observa una banda a la misma altura de la que se obtuvo en las muestras 10-12 y 15, sin embargo la intensidad de estas, es baja lo cual sugiere que la reacción está realizándose, aunque no en las condiciones óptimas. Las de los carriles 1-3, en las que se utilizó ADN sin diluir, presentan un barrido por el exceso de ADN. La concentración de cloruro de magnesio se mantuvo fija en 0.75 mM,

En la muestra del carril 13, no se obtuvo producto. La reacción fue realizada a 50 °C, con la dilución 1:10 de ADN de camarón sano a 0.75 mM de cloruro de magnesio.

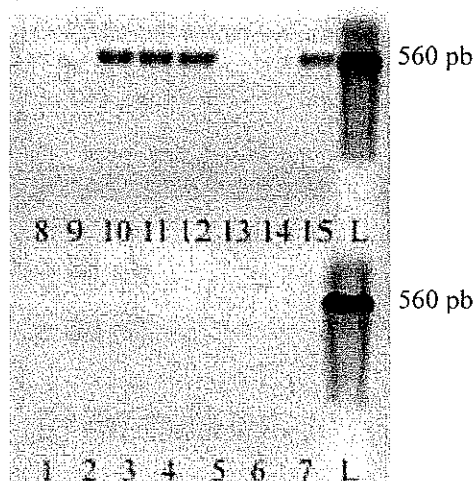


FIGURA 5. Electroforesis de productos de PCR como prueba de presencia del WSSV en muestras (productos de PCR de un segmento del gen VP28). Variables utilizadas: concentración de cloruro de magnesio, concentración de ADN y temperatura. La relación de las variables está descrita en la tabla XXXII. La línea marcada con el número 13 corresponde al control negativo⁵. Las líneas marcadas "L" corresponden a un fragmento de ADN de 560 pb.

Las condiciones establecidas para la PCR, con los cebadores de Vega (2003), fueron: cloruro de magnesio 1.55 mM, dilución de ADN 1:10 y temperaturas de alineamiento 49, 50.2 y 51⁰C. Estas muestras difieren en la temperatura de alineamiento (carril 10.- 51, 11 y 15.- 50.2, 12.- 49 ⁰C), lo cual significa, que la variación entre estas temperaturas no causa un efecto visible en los productos.

⁵ Reacción de PCR con camarón no infectado realizada a 50° C.

AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS ESPECÍFICOS

Producto de los genes VP15, VP19 y VP24

Del gen VP15, se obtuvieron ocho productos sobre la banda de 560 pb, en un intervalo de temperatura (T_m) de 45 a 70 °C (figura 6, carriles 1-8). La temperatura de alineamiento designada por el programa en el cual se diseñaron los iniciadores (FAST PCR) es 66.9 °C. La T_m experimental para la reacción es de 49.8 °C (carril 7). Los testigos negativos están representados en los carriles 9 y 10 a una temperatura (T_m) de 65.2 y 49.8 °C respectivamente.

Asimismo, del gen VP19 se obtuvieron ocho productos (figura 6, carriles 11-18) por arriba de la banda de 560 pb, en el mismo intervalo de temperatura usado con el gen VP15. Debido a que los iniciadores fueron seleccionados individualmente, no se tiene una T_m designada por el software FAST PCR, por lo cual se determinó experimentalmente. La T_m óptima estimada para la reacción fue de 65.2 °C (carril 13, estimación cualitativa). Los testigos negativos están representados en los carriles 19 y 20 a una temperatura de 65.2 y 49.8 °C respectivamente.

Por último, del gen VP24 se obtuvieron ocho productos (figura 6, carriles 21-28), por arriba de la banda de 560 pares de bases, en el mismo intervalo de temperatura usado con los genes VP15 y VP19. La T_m designada por el programa FAST PCR es de 62.2 °C. Bajo las condiciones experimentales descritas, la T_m es de 60.6 °C (carril 24, estimación cualitativa). Los testigos negativos están representados en los carriles 29 y 30 a una temperatura de 65.2 y 49.8 °C respectivamente.

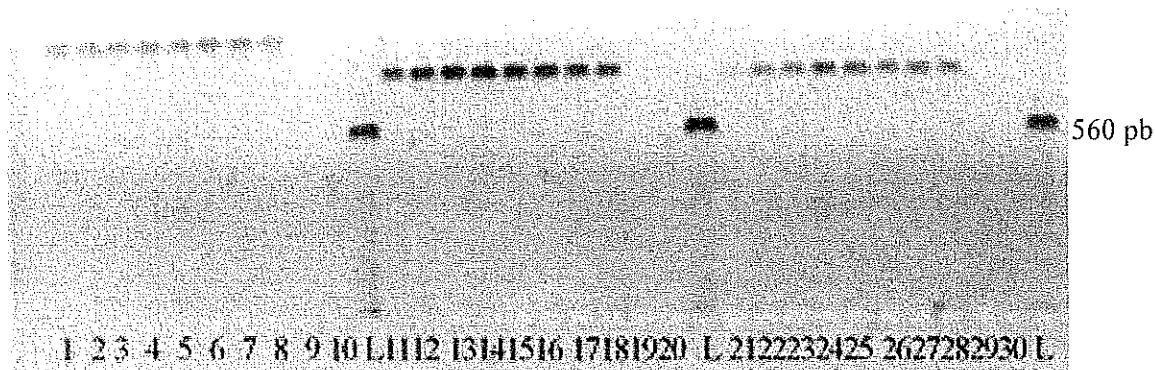


FIGURA 6. Electroforesis de los productos de amplificación de los genes VP15, VP19 y VP24, en un intervalo de temperatura de 46.8 a 70° C⁶. Las líneas del 1 al 10 corresponden al gen VP15, las líneas del 11-20 al gen VP19 y las líneas del 21-30 al gen VP24. Los carriles 9, 19 y 29 son controles negativos, los "L" son fragmentos de ADN de 560 pb.

Productos de los genes VP26 y VP28

Se obtuvieron seis productos del gen VP26 (figura 7, carriles 3-8), por debajo de la banda de 560 pb. Para estas reacciones, fue utilizado el intervalo de temperatura referido en la sección anterior, bajo las mismas condiciones de reacción para estimar la T_m. Sin embargo, en éste caso, la reacción sólo sucede hasta los 65.2 °C en su límite superior. Por arriba de ésta temperatura (en el gradiente) no se observa ningún producto (carriles 1 y 2). La T_m recomendada por el programa FAST PCR para los iniciadores del gen VP28 es de 62.4 °C, mientras que la determinada experimentalmente es de 49.8 °C, sin embargo, puede observarse que en todo el gradiente se lleva a cabo la amplificación de manera eficiente. Los testigos negativos están representados en los carriles 9 y 10 a 65.2 y 49.8 °C respectivamente.

⁶ Relación de temperaturas. Carriles 1, 11, 21 (70 °C); 2, 12, 22 (68.2 °C); 3, 13, 23 (65.2 °C); 4, 14, 24 (60.6 °C); 5, 15, 25 (54.1 °C); 6, 16, 26 (51.6 °C); 7, 17, 27 (49.8 °C); 8, 18, 18 (46.8 °C); 9, 19, 29 (65.2 °C) y 10, 20, 30 (49.8 °C).

Del gen VP28 se obtuvieron ocho productos de PCR (figura 7, carriles 12-19), a la altura de la banda de 560 pb, fue utilizado el mismo gradiente de temperatura y las mismas condiciones de reacción de las secciones anteriores. El programa FAST PCR recomienda una T_m de 66.6 °C, la determinada experimentalmente es de 65.2 °C (carril 13). Los testigos negativos están representados en los carriles 20 y 21 a 65.2 y 49.8 °C respectivamente.

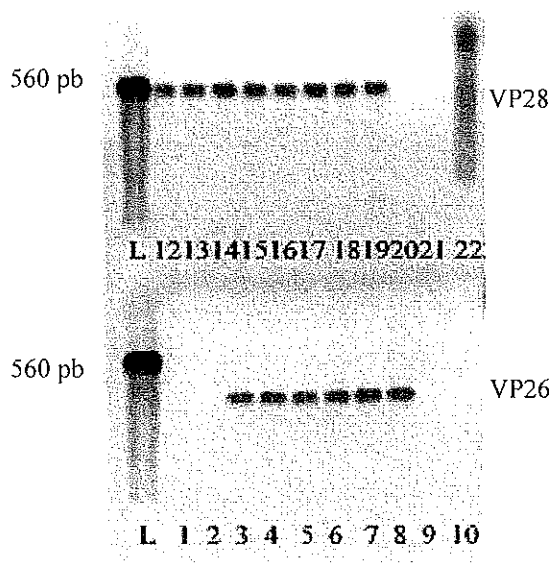


FIGURA 7. Electroforesis de los productos de PCR de los genes VP28 y VP26. Líneas del 12 al 19 y del 1 al 9 respectivamente, en un intervalo de temperatura de 70 a 45 °C⁷. Las líneas de las muestras (9, 10, 19 y 20) son el resultado de la reacción de PCR con camarón no infectado. La línea 22 corresponde a una extracción de ADN no exitosa de camarón infectado. L es un fragmento de ADN de 560 pb.

⁷ Relación de temperaturas. Carriles 1 y 12.- 70, 2 y 13.- 68.2, 3 y 14.- 65.2, 4 y 15.- 60.6, 5 y 16.- 54.1, 6 y 17.- 51.6, 7 y 18.- 49.8, 8.- 46.8, 20.- 45 °C. Las reacciones de las líneas 9, 19 se realizaron a 65.2 °C y las correspondientes a las líneas de 10 y 20 a 49.8 °C.

Producto del gen RR2

Se obtuvieron ocho productos de PCR (figura 8, carriles 1-8), bajo la banda de 560 pb, en un intervalo de temperatura de 75 a 50 °C, las condiciones de reacción están descritas en las tablas (XXXIII y XXXIV). El programa FAST PCR recomienda 64.9 °C de T_m. Sin embargo, la temperatura óptima experimental es de 59.1 °C (carril 5). Los testigos negativos se localizan en los carriles 9 y 10, estas reacciones se realizaron a 70.2 y 54.8 °C respectivamente.

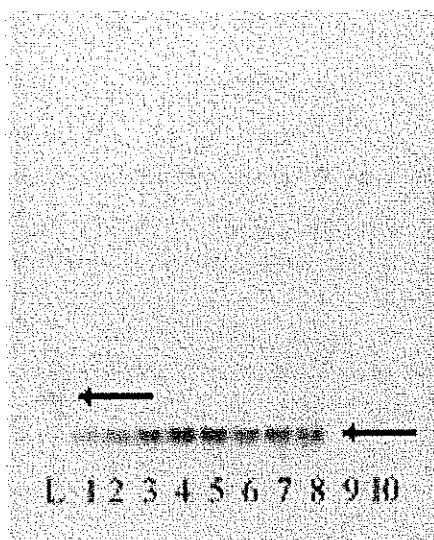


FIGURA 8. Electroforesis de los productos de PCR del fragmento del gen RR2 en un intervalo de temperatura de 75 a 50 °C⁸.

⁸ Relación de temperaturas. Carril 1.- 75 °C, 2.- 73.2 °C, 3.- 70.2 °C, 4.- 65.6 °C, 5.- 59.1 °C, 6.- 54.8 °C, 7.- 51.8 °C, 8.- 50 °C y 9.- 70.2 °C.

Producto de los genes RR1 y PK1

Del gen RR1 se obtuvieron tres productos de PCR (figura 9, carriles 2-4), bajo la banda pesada del carril "L" (producto de PCR del gen VP26). El programa FAST PCR recomienda 65 °C, de T_m para los iniciadores diseñados. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales descritas en las tablas XXXIII y XXXIV, la reacción a dicha temperatura, tiene un rendimiento bajo, evidente por el patrón de disminución en la intensidad de la banda que presentan los productos hacia la temperatura más baja. Las reacciones se realizaron a 75, 73.3 y 69.3 °C, aumentando la intensidad de las bandas conforme se incrementaba esta. Después del máximo rendimiento de la reacción, decae a los 73.3 °C y no se obtiene producto a los 75 °C (carril 1). Por lo tanto la T_m óptima experimental es de 73.3 °C (carril 2). El testigo negativo está ubicado en el carril 5, la reacción se realizó a 71.3 °C (T_m).

Del gen PK1 se obtuvieron cuatro productos a una altura similar a la de banda del gen RR1, bajo la banda pesada del carril "L" (figura 9), en un intervalo de temperatura de 75 a 66.7 °C. El rendimiento máximo de la reacción ocurre a los 66.7 °C (T_m) y disminuye conforme aumenta la temperatura hacia los 75 °C. El testigo negativo se localiza en el carril 10, ésta reacción se realizó a 71.3 °C (T_m favorable para la reacción con ADN del WSSV).

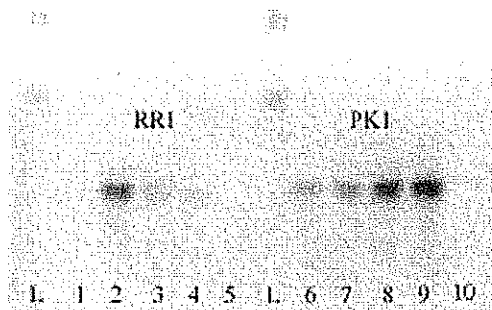


FIGURA 9. Electroforesis de los productos de PCR de los genes RR1 y PK1. En un intervalo de temperatura de 75 a 71.3 °C⁹. Líneas 1-4 gen RR1, línea 5 testigo negativo, líneas 6-9 gen PK1, línea 10 testigo negativo. L son los productos amplificados de los genes VP26 y VP28 (banda inferior y superior respectivamente).

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

De los productos de PCR, se tomaron 100 µL (de cada uno) para su purificación, a partir de los cuales se recuperaron dos volúmenes de 50 µL. El primer volumen se muestra en la figura 10, en los carriles 1 y 3 se cargaron 5 µL, en el resto 3 µL. De izquierda a derecha se localizan los productos recuperados de los genes VP (15, 19, 24, 26, 28), RR1, RR2, PK1 y el VP28 de 461 pb, del PCR con los cebadores de Vega (2003). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidío a 80 voltios/cm durante 0.5 h.

⁹ Relación de temperaturas. Carril 1.-75 °C, 2.- 73.3 °C, 3.- 69.3 °C.- 4.-66.7 °C, 5.-71.3 °C, 6.- 75 °C, 7.- 73.3 °C, 8.- 69.3 °C y 9.- 66.7 °C.

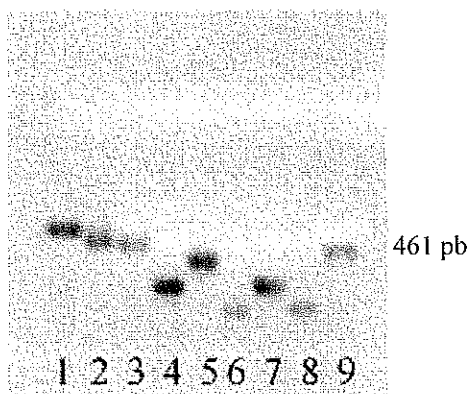


FIGURA 10. Electroforesis que muestra los productos de la PCR purificados. Carril 1.- gen VP15, 2.- gen VP19, 3.- gen VP24, 4.- gen VP26, 5.- gen VP28, 6.- gen RR1, 7.- gen RR2, 8.- gen PK1 y 9.- producto de PCR, gen VP28 (461 pb) de los iniciadores de Vega (2003).

El segundo volumen, fue recuperado repitiendo los puntos 5 y 6 del protocolo, aparece en la figura 11. Se cargaron 5 μ L en cada pozo, en el orden que sigue: genes VP (15, 19, 24, 26, 28), PK1, RR1 y RR2. Se estimó visualmente la concentración de ADN de los productos purificados, para las reacciones de secuenciación consecuentes. La valoración es la siguiente: 40 ng (carril 1), 60 ng (carriles 2 y 3), 450 ng (carril 4), 200 ng (carril 5), 120 ng (carriles 6 y 7) y 500 ng (carril 8). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio a 80 v/cm durante 1 hora.

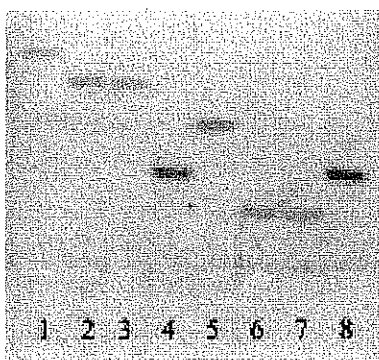


FIGURA 11. Electroforesis de productos de PCR purificados. Segundo lavado del cartucho de recuperación del paquete de purificación. Volumen de carga 5 μ L, en carril 1.- gen VP15, 2.- gen VP19, 3.- gen VP24, 4.- gen VP26, 5.- gen VP28, 6.- gen PK1, 7.- gen RR1 y carril 8.- gen RR2.

De los productos de PCR purificados se enviaron alícuotas de 12 μ L para las reacciones de secuenciación a la empresa “Sequegene” de la ciudad de San Diego. Las secuencias obtenidas son presentadas en la siguiente sección.

SECUENCIAS OBTENIDAS

Se obtuvieron doce secuencias, siete de ellas, “consenso” de las que se lograron con los iniciadores F y R. De estas, las de los genes VP15, VP19, VP24, VP26 y RR2 se integraron a “Gen Bank” y están descritas en las tablas XVIII-XXI y XXV. Del gen VP28, obtuvimos tres secuencias, la primera mediante el uso los cebadores diseñados en este estudio, la segunda usando los iniciadores de Vega (2003) y la tercera ensamblando las cuatro secuencias generadas por los dos pares de iniciadores antes mencionados (tablas XXII-XXIV). Los números de acceso están referidos en la tabla II, junto con sus longitudes, codones de inicio y contenido de bases. Las cuatro restantes, corresponden a las secuencias no ensambladas de los genes PK1 y RR1 (tabla III, características; tablas XXVI-XXIX secuencias).

Del gen que codifica para la subunidad larga de la ribonucleótido reductasa se obtuvieron dos secuencias, la primera producto del PCR con el iniciador “F” (tabla XXVI), la segunda a partir de la reacción con en el iniciador “R” (tabla XXVII). Dichas secuencias se presentan individualmente, debido a que no existe una región de traslape entre ellas. El producto teórico esperado para los cebadores utilizados (tabla II), diseñados a partir de la secuencia reportada por Van Hulten *et al*, (2000) es de 2284 pb. Tomando esto en consideración y analizando la suma de los productos que se

obtuvieron, tentativamente existe una región de 115 pares de bases que las separa, por lo cual no es posible integrar ambas secuencias. Debido a este hecho, existen bases indeterminadas y posiblemente bases mal asignadas, por esta razón dichas secuencias no han sido publicadas en "Gen Bank". Las bases indeterminadas se indican con una "N". Las posibles bases mal asignadas serán rectificadas mediante la obtención de cebadores que flanquean la región que existe entre ellas, a partir de las secuencias que aquí presentamos. Una vez obtenido el fragmento será secuenciado y las secuencias resultantes serán fusionadas con las aquí reportadas para obtener una secuencia consenso.

TABLA II. Características de las secuencias "consenso" de la cepa mexicana. Acceso a "Gen Bank", longitudes, codones de inicio y relación de bases.

Gen	Acceso a Gen Bank	Longitud En pb	Codón de inicio	Contenido de bases			
				A	C	G	T
VP15	AF713371	178	2	52	51	51	24
VP19	AF713372	290	3	70	70	77	73
VP24	AF713373	301	1	108	57	63	73
VP26		960		317	201	174	268
VP28		533	1	147	132	127	126
VP28		429	1	120	101	89	118
VP28		701	1	189	175	156	181
RR2	AF713374	984	1	269	219	193	303

Del gen que codifica para la proteína cinasa, se obtuvo un resultado similar al de la subunidad larga de la ribonucleótido reductasa. Tomando en consideración que la longitud del producto teórico esperado según la secuencia publicada por (Liu *et al*, 2001) es de 2134 pb, lo cual significa que existe una región de aproximadamente 385 pb entre los fragmentos obtenidos de los iniciadores "F" y "R" de 708 (tabla XXVII) y

1041 (tabla XXIX) pb respectivamente. La estrategia metodológica a seguir para establecer la secuencia entre los fragmentos obtenidos, será la misma que la que se utilizará para el gen que codifica para la subunidad larga de la ribonucleótido reductasa.

TABLA III. Características de las secuencias no ensambladas de los iniciadores "F" y "R" de la cepa mexicana. Gen, longitud y relación de bases.

Gen	Iniciador	Longitud En pb	Contenido de bases				
			A	C	G	T	N
RR1	F	1022	301	247	181	265	28
	R	907	273	163	223	241	7
PK1	F	708	220	168	147	173	0
	R	1041	309	177	308	236	11

ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Resultado del blast

A partir de las secuencias consenso, obtenidas de los genes VP (15, 19, 24, 26, 28) y RR2 se realizaron alineamientos para comparar las secuencias obtenidas con las publicadas en "Gen Bank". Sólo se utilizaron las consenso, debido a que en ellas no existen nucleótidos indeterminados o mal asignados, ya que las secuencias consenso están rectificadas en ambos sentidos, esto es: en sentido "río arriba" y en antisentido. A continuación se presentan en las tablas IV-IX, los resultados del "BLAST" con mayor número de identidades. En la columna de la izquierda está referido el número de alineamiento, en la siguiente columna el número de acceso a "Gen Bank" de la secuencia que produjo el alineamiento, en la columna siguiente el número de identidades entre la secuencia alineada y la obtenida de los genes ya mencionados,

seguido de una breve descripción de la información correspondiente a la secuencia alineada en la siguiente columna y por último, en la columna de la derecha el hospedero a partir del cual fue aislado el virus.

La tabla IV, muestra 13 alineamientos de la secuencia consenso del gen VP15, con identidades del 100 al 98%. Nótese que en algunas secuencias no está indicado el hospedero (alineamiento 2, y del 8 al 13), esto es debido a que en algunos casos sólo se han publicado las secuencias de forma directa a “Gen Bank”, en algunos casos tampoco se indica el año o de donde proviene el aislado (alineamientos 9 y 13), esto es debido a la misma situación descrita en la parte anterior.

TABLA IV. Resultados del BLAST de la secuencia del gen VP15.

Alin.	Número de acceso en Gen Bank (gi)	Número de identidades	Descripción	Hospedero
1	38156682	178/178	India 2003. Por publicar.	<i>P. inidicus</i>
2	34761157	178/178	Corea 2001. Publicado directamente en “Gen Bank” (PDGB)*	No reportado
3	34145683	178/178	Indonesia 1997. (PDGB)	<i>P. monodon</i>
4	30145681	178/178	Japón 1998. (PDGB)	<i>P. japonicus</i>
5	30145679	178/178	EUA 1998. (PDGB)	<i>P. setiferus</i>
6	30145677	178/178	China 1999. (PDGB)	<i>P. chinensis</i>
7	30145675	178/178	China 1995. Gen completo. (PDGB)	<i>P. japonicus</i>
8	19481591	178/178	WSSV-Tw Taiwán Genoma completo	No reportado
9	14422484	178/178	Proteína de unión ARNm. (PDGB)	No reportado
10	17016399	178/178	WSSV-Ch China. Genoma completo	No reportado
11	15021392	178/178	WSSV-Th Tailandia. Genoma completo	No reportado
12	26292341	176/178	China (Dalian) 1995. ARNm. (PDGB)	No reportado
13	29291301	176/178	Gen completo. (PDGB)	No reportado

* Las siglas: PDGB serán utilizadas para abreviar “Publicado directamente en Gen Ban”.

La tabla V, muestra el resultado del BLAST de la secuencia consenso del gen VP19, con identidades del 100 al 99%, se produjeron 14 alineamientos. Al igual que en la tabla anterior, en la información adicional de las secuencias, no está indicado el hospedero y en algunas otras no se indica el año o de donde proviene el aislado, esto es debido a la situación ya mencionada de la parte anterior.

TABLA V. Resultados del BLAST de la secuencia del gen VP19.

Alin.	Número de acceso en Gen Bank (gi)	Número de identidades	Descripción	Hospedero
1	19481591	290/290	WSSV-Tw	No reportado
2	26418648	290/290	Gen completo. (PDGB)	No reportado
3	32309276	289/290	Corea 2001. Gen completo. (PDGB)	<i>P. chinensis</i>
4	30145693	289/290	Indonesia 1997. Gen completo. (PDGB)	<i>P. monodon</i>
5	30145691	289/290	Japón 1998. Gen completo. (PDGB)	<i>P. japonicus</i>
6	30145689	289/290	EUA 1998. Gen competo. (PDGB)	No reportado
7	30145687	289/290	China (Qindao) 1999. Gen competo.	No reportado
8	30145685	289/290	China (Dalian) 1995. Gen competo.	<i>P. japonicus</i>
9	29291604	289/290	Gen completo. (PDGB)	No reportado
10	17016399	289/290	WSSV-Ch	No reportado
11	15384186	289/290	ORF-2801. (PDGB)	No reportado
12	15021392	289/290	WSSV-Th	No reportado
13	38156684	286/287	India. Gen competo. (PDGB)	<i>P. inidicus</i>
14	29692430	70/70	China (Dalian) 1995. ARNm. (PDGB)	No reportado

Del "BLAST" de la secuencia consenso del gen VP24 (tabla XX), se obtuvieron 13 alineamientos. Con identidades del 100 al 99%. Los datos que hacen falta, referentes a las secuencias no han sido reportados (tabla VI).

TABLA VI. Resultados del BLAST de la secuencia del gen VP24.

Alin.	Número de acceso en Gen Bank (gi)	Número de identidades	Aislado/Año /Descripción	Hospedero
1	30145673	301/301	Indonesia 1997. Gen completo. (PDGB)	<i>P. monodon</i>
2	30145669	301/301	EUA 1998. Gen completo. (PDGB)	<i>P. setiferus</i>
3	30145667	301/301	China (Qindao) 1999. Gen completo. (PDGB)	<i>P. chinensis</i>
4	30145665	301/301	China (Qindao) 1995. Gen completo. (PDGB)	<i>P. japonicus</i>
5	17016399	301/301	WSSV-Ch	No reportado
6	15384190	301/301	ORF 4441(PDGB)	No reportado
7	15021392	301/301	WSSV-Th	No reportado
8	14290244	301/301	Gen completo. (PDGB)	No reportado
9	10863154	301/301	Gen completo. (PDGB)	No reportado
10	30145671	300/301	Japon 1998. Gen completo. (PDGB)	<i>P. japonicus</i>
11	38156688	300/301	India (PDGB)	<i>P. inidicus</i>
12	19481591	300/301	WSSV-Tw	No reportado
13	29291838	299/301	Gen completo. (PDGB)	No reportado

La secuencia del gen VP26, alinea con quince secuencias, con las cuales presenta de 100 a 98% de identidad. Las secuencias con las que fue alineada están indicadas en la tabla VII.

TABLA VII. Resultados del BLAST de la secuencia del gen VP26.

Alin.	Número de acceso en Gen Bank (gi)	Número de identidades	Aislado/Año /Descripción	Hospedero
1	19481591	1002/1004	WSSV-Tw	No reportado
2	17016399	1002/1004	WSSV-Ch	No reportado
3	9022396	1002/1004	Gen completo. Proteína estructural de 22kDa. Gen VP22. (PDGB)	No reportado
4	15021392	1002/1004	WSSV-Th	No reportado
5	29372838	1000/1004	Gen completo. Proteína estructural (PDGB)	No reportado
6	6856160	903/903	Gen completo. Proteína estructural de 26 kDa (PDGB)	No reportado
7	15824655	711/711	Gen completo. Proteína de envoltura P22 ARNm.	No reportado
8	30027314	633/633	Indonesia 1997. Gen completo (PDGB)	<i>P. monodon</i>
9	30027312	633/633	Japon 1998. Gen completo (PDGB)	<i>P. japonicus</i>
10	30027310	633/633	EUA 1998. Gen completo (PDGB)	<i>P. setiferus</i>
11	30027308	633/633	China (Qindao)1999 Gen completo (PDGB)	<i>P. chinensis</i>
12	30027306	633/633	China (Dalian) 1995. Gen completo (PDGB)	<i>P. japonicus</i>
13	38156690	615/615	India. Gen completo. (PDGB)	<i>P. indicus</i>
14	14290246	615/615	Gen completo. (PDGB)	No reportado
15	29292121	615/615	Gen completo. (PDGB)	No reportado

TABLA VIII. Resultados del BLAST de la secuencia consenso del gen VP28.

Alin.	Número de acceso en Gen Bank (gi)	Número de identidades	Aislado/Año /Descripción	Hospedero
1	19481591	701/701	WSSV-Tw	No reportado
2	17016399	701/701	WSSV-Ch	<i>P. setiferus</i>
3	9022394	701/701	Taiwán. Proteína estructural de 25kDa	No reportado
4	6856162	701/701	Proteína estructural de 28 kDa. Gen completo. (PDGB)	No reportado
5	14422486	701/701	ARNm de proteína estructural. Gen completo. (PDGB)	No reportado
6	15021392	688/688	WSSV-Th	No reportado
7	29372840	687/694	Proteínas estructural (PDGB)	<i>P. chinensis</i>
8	30027322	569/569	Japón 1998. Gen completo.	<i>P. japonicus</i>
9	30027320	569/569	EUA (Carolina) 1998. Gen completo. (PDGB)	<i>P. setiferus</i>
10	30027318	569/569	Indonesia 1997. Gen completo. (PDGB)	<i>P. monodon</i>
11	30027316	569/569	China (Qindao) 1999.	<i>P. chinensis</i>
12	30026805	568/569	China (Dalian) ARNm. (PDGB)	<i>P. japonicus</i>
13	32765536	563/563	Corea 2001. Gen completo.	No reportado
14	27368093	563/563	Gen completo. (PDGB)	<i>P. Japonicus</i>
15	50818202	562/563	China (GuangXi)	<i>Camarón</i>
16	20530711	562/563	Gen completo. (PDGB)	No reportado
17	14290248	562/563	Gen completo. (PDGB)	No reportado
18	38156686	561/563	India Gen completo. (PDGB)	<i>P. indicus</i>
19	15978113	44/44	Gen de la proteína cinasa	No reportado

La tabla IX, muestra el resultado del BLAST de las secuencias con las cuales se alineo la secuencia consenso del gen RR2, alineamientos de los cuales se observan identidades del 100 al 99.8% de un total de 5 alineamientos.

TABLA IX. Resultados del BLAST de la secuencia del gen RR2.

Alin.	Número de acceso en Gen Bank (gi)	Número de identidades	Descripción	Hospedero
1	19481591	981/981	WSSV-Tw	No reportado
2	17016399	981/981	WSSV-Ch	No reportado
3	15021392	981/981	WSSV-Th	No reportado
4	14189947	981/981	Taiwán. RR unidad corta. Gen completo. (PDGB)	No reportado
5	7672988	980/981	RR unidad corta. Gen completo. (PDGB)	No reportado

Variaciones nucleotídicas

En la tabla XXVII, están indicadas las variaciones nucleotídicas entre aislados. A destacarse la variación de la secuencia de la cepa mexicana "0" en el gen VP19 y la de Taiwán "12" en el VP24.

TABLA X. Variaciones nucleotídicas entre secuencias.

Gen	Posición	Tipo de variación	No. Secuencia que varia
VP15	37	A X G	12
	39	G X A	12
	62	T X C	13
	166	T X C	13
VP19	19	T X C	13
	32	T X C	3
	171	T X C	10 y 11
	187	T X A	9
	193	A X T	1, 2 y 0
VP24	35	N X G	10
	52	G X A	13
	83	G X A	13
	252	G X A	11 y 12
VP26	1	A X T	7
	2	T X G	7
	574	G X A	15
VP28	88	G X A	14 y 15
	413	T X C	16
	452	T X C	17
	454	T X C	17
RR2	79	T X C	5

Variaciones de la secuencia de aminoácidos entre aislados por gen

En esta sección se presentan las variaciones de las secuencias putativas de aminoácidos obtenidas, reveladas por el alineamiento de estas, con las disponibles en "Gen Bank".

TABLA XI. Variaciones de aminoácidos en las secuencias putativas de proteínas entre aislados geográficos.

Gen	Longitud	Aminoácido que varía	Posición	No. De secuencias que varían	No. De secuencias conservadas
VP15	61	E x G	13	1	10
		G x S	14	1	10
		V x A	56	1	10
VP19	121	S x P	9	1	13
		V x A	15	1	13
		P x S	66	2	12
		V x D	71	1	13
		V x D	73	6	8
VP24	208	X x V	20	2	11
		E x K	36	1	12
		R x K	92	1	12
		X x E	115	1	12
VP26	204	R x K	192	1	15
VP28	204	R x H	40	2	16
		F x S	162	1	17
RR2	360	F x S	55	1	4

ANÁLISIS A PARTIR DE SECUENCIAS

Distancia genética: índice Jukes-Cantor (JC) y árboles Neighbor-Joining (NJ)

Se obtuvieron los índices de distancia genética Jukes-Cantor entre aislados, bajo los criterios establecidos para el análisis de secuencias (tablas XXVIII-XXXIII), a partir de los cuales se generaron los árboles o fenogramas "NJ". Los números de la primera columna y renglón de las tablas XXVIII-XXXIII y los adyacentes a las ramas de cada árbol son la posición del BLAST. Los rotulados con "cero" corresponden a la cepa mexicana.

Debido a que la mayoría de los aislados geográficos no cuentan con las seis secuencias correspondientes a los genes VP (15, 19, 24, 26 y 28) y RR2, no puede realizarse un análisis completo en el cual se integre la información de este grupo de genes, en aislados geográficos particulares, esto sólo puede realizarse en el caso de las cepas de WSSSV-Th, WSSV-Tw y WSSV-Ch, ya que estas cuentan con todas las secuencias del grupo de genes antes mencionado. Por lo cual, para analizar un mayor número de datos, el cómputo de índices de distancia genética y la generación de árboles filogenéticos se realizó por gen.

En la figura 12, correspondiente al gen VP15, puede observarse un grupo formado por 12 cepas y además 2 aislados separados de este por 0.011 y entre sí por 0.023 (agrupación evidente desde la tabla XXX). Cabe destacar que la cepa mexicana se encuentra dentro del grupo mayor el cual comparte el 100% de identidad.

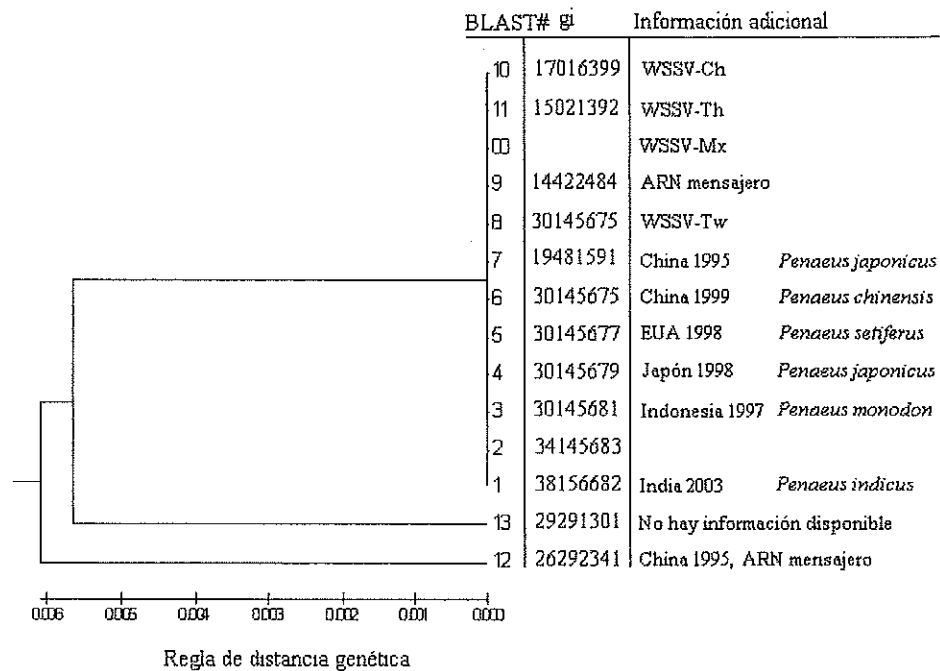


FIGURA 12. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen VP15.

Los aislados del gen VP19 presentan un arreglo de 6 grupos, el primero de 3 aislados, siendo éste, donde está localizada la cepa mexicana, el segundo separado del primero por 0.004, el tercero separado del segundo por 0.007; existe un cuarto grupo de seis cepas, separado de su vecino más cercano por 0.007 y una última cepa separada del grupo anterior por 0.004.

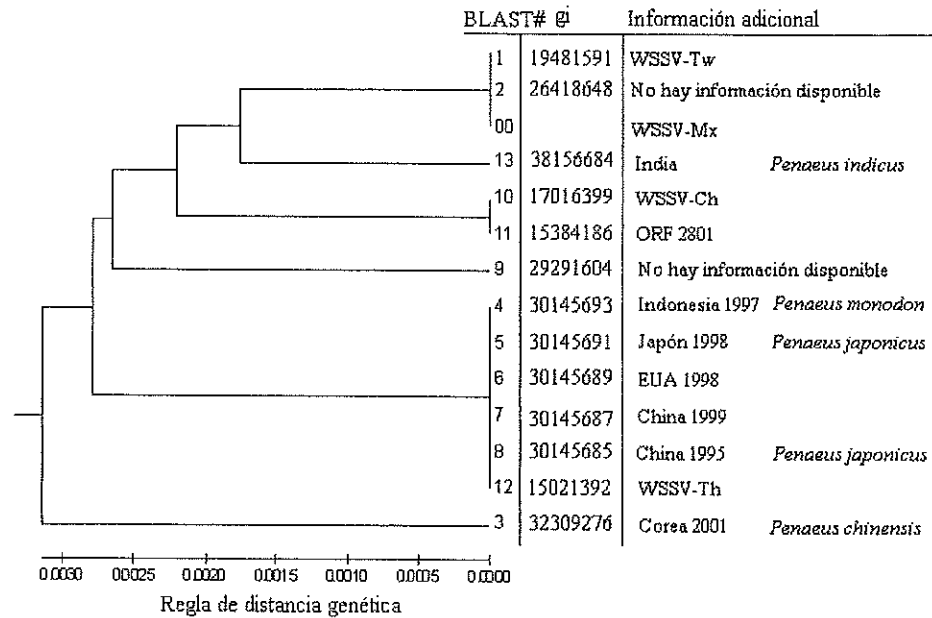


FIGURA 13. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen VP19.

Para el gen VP24 la agrupación dada es la siguiente (ver figura 14): el grupo mayor de aislados presenta un 100% de identidad, formado por un grupo de 11 secuencias incluyendo la secuencia correspondiente del aislado mexicano, el siguiente está formado por dos cepas separadas del primer grupo por 0.003 y a su vez separado del último por 0.010.

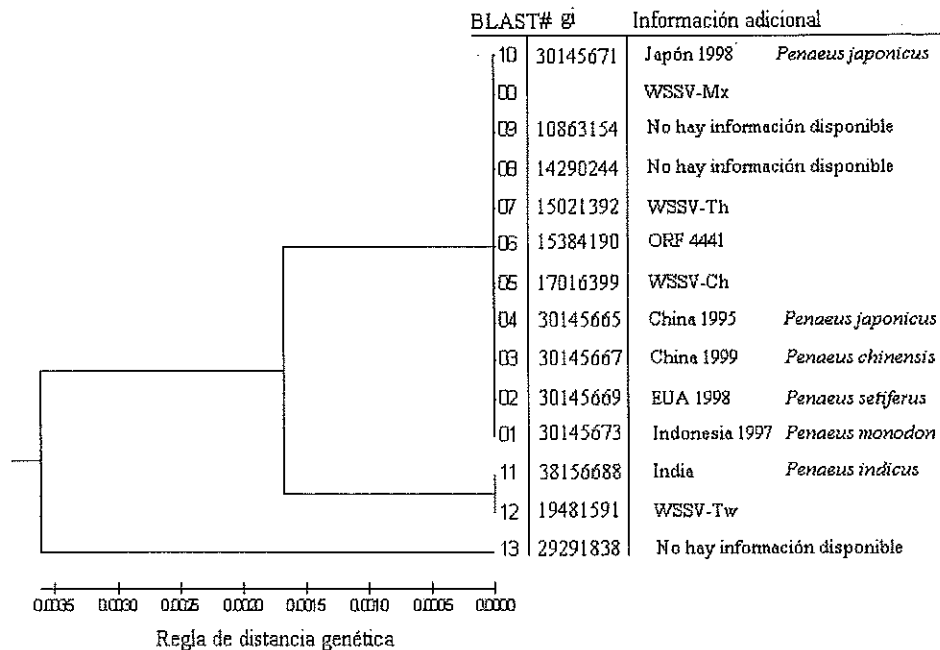


FIGURA 14. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen VP24.

En el árbol correspondiente al gen VP26 (figura 15), se observa una estructura muy similar a la de los genes VP15 y VP24. Un primer grupo formado por 14 aislados que incluye a la cepa mexicana, separado del aislado 15 (gi: 29292121) por 0.002 y éste a su vez de la cepa 07 (gi: 15824655) por 0.005.

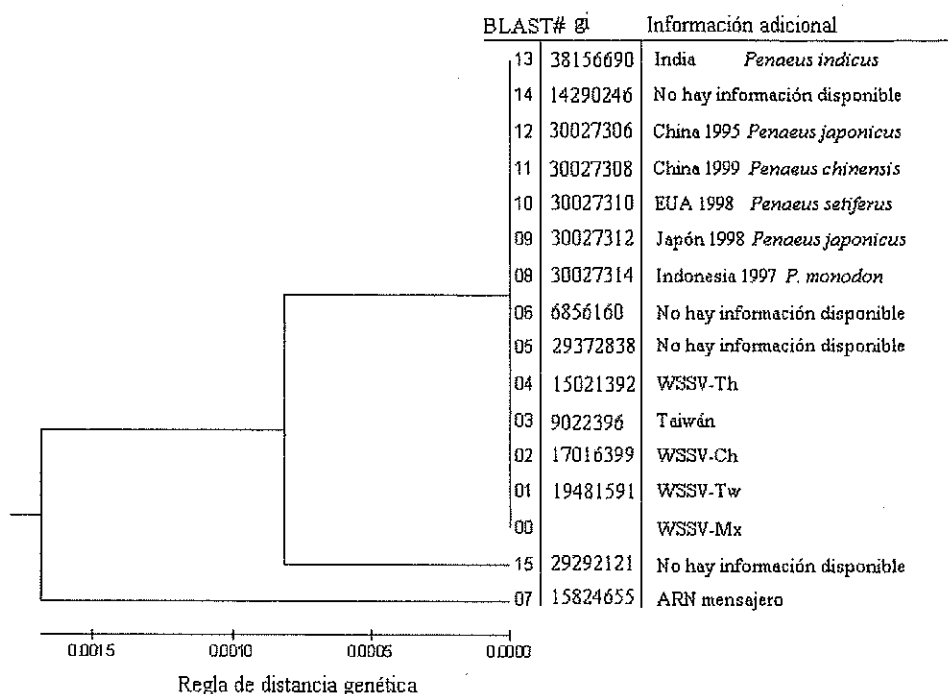


FIGURA 15. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen VP26.

El árbol de la figura 16 correspondiente al gen VP28, fue generado mediante una secuencia resultado de la fusión de las obtenidas de los iniciadores diseñados en este estudio (tabla XII) y de los cebadores de Vega (2003). Cada secuencia contiene una región exclusiva de la amplificación con cada par de iniciadores. La secuencia derivada de estas, por lo tanto, contiene una región de traslape.

La estructura general está formada por un grupo que consta de 14 aislados incluyendo el mexicano, una cepa separada del primer grupo por 0.002 y esta, a su vez, por 0.004 del segundo grupo que está separado del último aislado por 0.005.

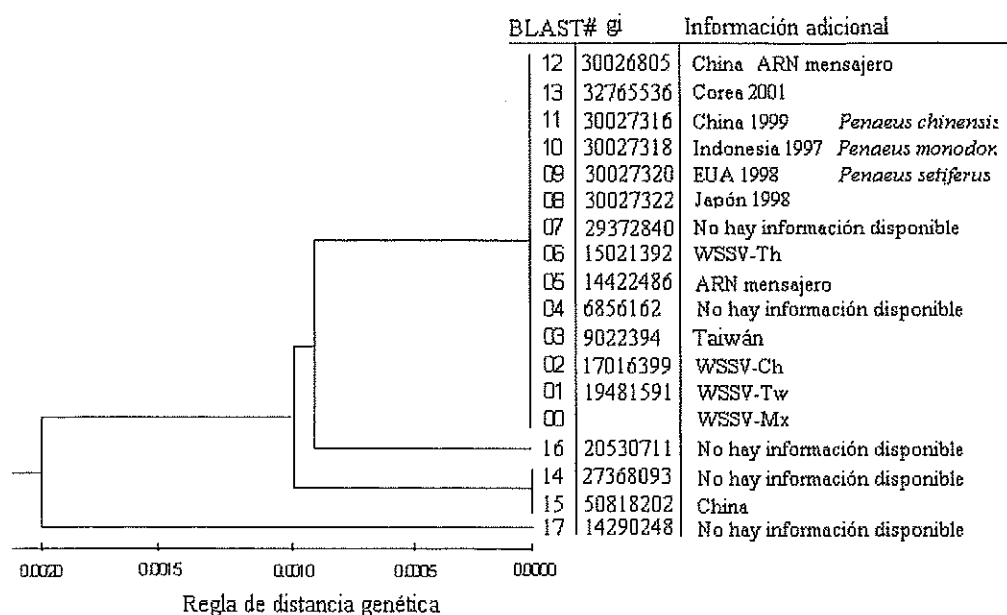


FIGURA 16. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen VP28.

En la figura 17, se muestra el árbol obtenido del gen RR2 el cual presenta un grupo de cuatro cepas separado por 0.001 de la secuencia 5, reportada por Van Hulten *et al* (2000). Esta agrupación consta de un cambio en la secuencia 5, de una timina (t) que sustituye una citosina (c), como se muestra en la tabla X, sin embargo la relevancia de este cambio trasciende a la secuencia primaria de la proteína putativa que este gen codifica, provocando un cambio de aminoácido del tipo polar no iónico (serina) por otro aromático no polar (fenilalanina) como muestra la tabla XI.

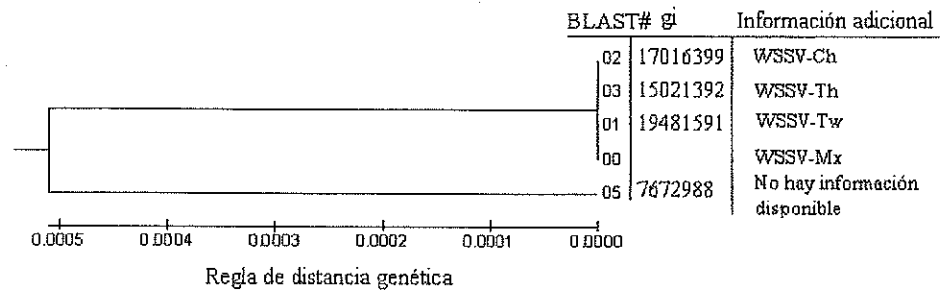


FIGURA 17. Fenograma Neighbor Joining (NJ) basado en el índice de distancia genética Jukes-Cantor (JK) de los aislados geográficos del WSSV, generado a partir de las secuencias del gen RR2.

DISCUSIÓN

El análisis general de las secuencias de los genes de las proteínas mayores de la cepa mexicana del WSSV, con respecto a las de los aislados depositados en “Gen Bank”, indica un alto grado de conservación en sus secuencias. Sin embargo, existen diferencias entre las secuencias reportadas, (como se muestra en la tabla X) que permiten diferenciar entre ellas. A destacarse, que las secuencias de la cepa mexicana, generalmente se ubican dentro del grupo de secuencias que no varía, salvo en la del gen VP19 que presenta una mutación de adenina por timina en la posición 193, que la agrupa con la cepa de Taiwán y la secuencia gi: 26418648; a su vez las distingue de sus homólogas de China y Tailandia. La cepa china, en este mismo gen presenta una mutación que la diferencia de Taiwán. Las cepas de China, Tailandia y Taiwán por su parte, que cuentan con el genoma secuenciado, son idénticas a las de la cepa mexicana en los genes VP15, VP26, VP28 y RR2. Una mutación del gen VP24 de guanina por adenina en la posición 252, de la cepa de Taiwán, la separa de sus homólogas de China, México y Tailandia. Por lo tanto con las secuencias de los genes VP19 y VP24, es posible distinguir entre las cepas de México, China, Tailandia y Taiwán.

El alto grado de conservación en las secuencias de los genes VP15, VP26, VP28 y RR2 sugiere, que a nivel funcional (en la proteína que codifican) son exitosas como tales, vg: la proteína VP28 (que se localiza en la envoltura) en el ingreso del virus a la célula, la VP19 en la entrada de éste al núcleo (localizada entre la nucleocápside y la envoltura); en el caso de que sea elucidado su papel en estos procesos y la RR2, por su parte (encargada de la conversión de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos) en la

síntesis de ADN. En pocas palabras, en el proceso de infección, tomando como concepto operativo: *Infección*.- Es el resultado acumulativo de los procesos de replicación y expresión génica (Cann, 2001).

Las mutaciones presentes en las secuencias del gen VP19, que permiten diferenciar entre las cepas de China, Tailandia, y a su vez, distinguirlas de las de México y Taiwán apuntan hacia el hecho de que la cepa mexicana comparte el mismo origen que la de Taiwán. Las variaciones de los genes VP19 y VP24, pueden explicar, en cierto grado, la elevada carga viral en especies de cangrejos nativos de Asia (Kanchanaphum *et al*, 1998; Supamattaya *et al*, 1998), tomando en consideración que las proteínas que estos genes codifican se localizan en la nucleocápside (VP24) o entre ésta y la envoltura (VP19) de la cual ya han sido reportados cambios en el perfil estructural (Wang *et al*, 2000), si resultasen éstos en incapacitar al virus para ingresar al núcleo, y que por lo tanto no se replique.

El primer brote del WSSV, la hipótesis de Moon *et al* (2003) de la cepa primigenia de oriente y las variaciones en las secuencias de los genes VP19 y VP24 que permiten distinguir los cuatro aislados, promueven su capacidad para establecer el origen geográfico en el caso de la introducción de este virus en otros países.

En primera instancia, podríamos pensar que las variaciones mencionadas en este trabajo son poco significativas como tales, sin embargo, analizando las secuencias putativas de su traducción, se observa que el 73% de estas variaciones resultan en un cambio en la secuencia de aminoácidos. En cuanto al cambio de aminoácidos, 9 de 14 son de tipo de aminoácido. El cambio de serina (S) por prolina (P) observado en el gen

VP19, significa un cambio de un aminoácido con polaridad parcial negativa por un aminoácido no polar, lo cual puede ocasionar variaciones en la estructura terciaria de la proteína. Esto tendría que ser comprobado mediante el análisis de los modelos moleculares, para después llevarlo a un análisis de cristalografía de proteínas. Este fenómeno se repite al menos en ocho casos más, en los productos o secuencias putativas de los genes VP (15, 19, 24 y 28).

Los estudios de Wang *et al* (1998) sugieren la necesidad de un estudio más profundo de la respuesta a la infección por parte del hospedero, ya que en juveniles de camarón rosado (*Farfantepenaeus duorarum*) el efecto letal del virus fue sólo del 35 al 60% en contraste con los especímenes de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en los cuales la mortandad fue del 100%. Asimismo, estudiar profundamente en qué consisten las variaciones de las cepas que resultasen en diferencias en los grados de morbilidad, como el caso de la cepa de Texas en contraste con la de Washington, que presentan los extremos en los porcentajes de mortandad que estos provocan.

CONCLUSIONES

1. Las secuencias de los genes VP15, VP26, VP28 y RR2 de la cepa mexicana, son idénticas con respecto a sus homólogas de China, Tailandia y Taiwán.
2. La secuencia del gen VP19, presenta una mutación (adenina por timina) en la posición 193, que agrupa a la cepa mexicana con la de Taiwán y la secuencia gi: 26418648 y las distingue a su vez, de las de China y Tailandia, asimismo diferencia entre la cepa de China y Tailandia.
3. Una mutación (guanina por adenina) en la posición 252 del gen VP24 en la cepa de Taiwán, la hace diferente de las de China, México y Tailandia.
4. Con las secuencias de los genes VP19 y VP24 es posible diferenciar entre las cepas de China, México, Tailandia y Taiwán
5. El alto grado de conservación de los genes VP15, VP26, VP28 y RR2 sugiere que el virus las conserva porque son relevantes en el proceso infeccioso.

CONCLUSIONES

1. Las secuencias de los genes VP15, VP26, VP28 y RR2 de la cepa mexicana, son idénticas con respecto a sus homólogas de China, Tailandia y Taiwán.
2. La secuencia del gen VP19, presenta una mutación (adenina por timina) en la posición 193, que agrupa a la cepa mexicana con la de Taiwán y la secuencia gi: 26418648 y las distingue a su vez, de las de China y Tailandia, asimismo diferencia entre la cepa de China y Tailandia.
3. Una mutación (guanina por adenina) en la posición 252 del gen VP24 en la cepa de Taiwán, la hace diferente de las de China, México y Tailandia.
4. Con las secuencias de los genes VP19 y VP24 es posible diferenciar entre las cepas de China, México, Tailandia y Taiwán
5. El alto grado de conservación de los genes VP15, VP26, VP28 y RR2 sugiere que el virus las conserva porque son relevantes en el proceso infeccioso.

RECOMENDACIONES

La singularidad de las variaciones genéticas en las secuencias de ADN que presenta el WSSV en los distintos aislados geográficos y la transmisión de estas variaciones de un nivel molecular a otro (ADN-Proteína en la secuencia primaria putativa de la proteína que codifican) sugiere la necesidad de la realización de una exploración más amplia de este fenómeno y la necesidad de realizar estudios a nivel estructural y bioensayos para establecer si estos posibles cambios estructurales resultan en algún cambio funcional en alguna etapa del proceso infeccioso.

La estrecha relación genética de los aislados geográficos del WSSV y la posibilidad de poder distinguirlos en grupos particulares nos lleva a la necesidad de establecer cual es la relación filogeográfica del virus, lo cual forma parte de las perspectivas que promueve este estudio. Elucidar las causas de la diferencia entre los grados de morbilidad entre aislados geográficos parece ser la tarea más importante a realizar, ya que de esto puede surgir una forma de enfrentar los problemas causados por este virus. Ya sea estudiando las variaciones genéticas del virus, las variaciones genéticas del hospedero, las condiciones ambientales, o bien la plasticidad genética tanto del agente causal como del hospedero.

BIBLIOGRAFÍA

- Alijanabi S. M. y I. Martinez 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25:22:4692-4693.
- Altschul S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Meyers y D. J. Lipman 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Bonami J., S. Durand, D. Ligtner y R. Redman 1997. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 29:205-211.
- Cann A. J. 2001. *Principles of Molecular Virology*. 3ra edición. Academic Press. Gran Bretaña. Página: 169.
- Chang Y. S., S. E. Peng, H. C. Wang, H. C. Hsu, C. H. Ho, C. H. Wang, S. Y. Wang, C. F. Lo y G. H. Kou 2001. Sequencing and amplified restriction fragment length polymorphism analysis of ribonucleotide reductase large subunit gene of the white spot syndrome virus in blue crab (*Callinectes sapidus*) from american coastal waters. *Marine Biotechnology* 3, 163-171.
- ChromasPro Copyright © 2003-2004, Technelysium Pty. Ltd., all rights reserved.
<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>
- De la Rosa J. y Bonami J. 2002. Herramientas moleculares: una estrategia para la prevención de epizootias virales en cultivos de camarón. En: Martínez Córdoba

L.R. (ed.) Avances y tendencias en camaronicultura. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. AGT Editor. México, D.F.

De la Rosa J. 2003. "Elucidación de las causas de las diferencias en infectividad y virulencia de aislados geográficos de distintos tipos de virus que infectan camarones peneidos" CONACYT proyecto D42866-Z.

DNAzol <http://www.mrcgene.com/dnazol.htm>

Hew C., Zhang X., Huang C., Tang X y Zhuang Y 2003. Identification of structural proteins from shrimp white spot syndrome virus (WSSV) by 2DE-MS.

Huang C., X. Zhang, Q. Lin, X. Xun, Z. Hu y C. Hew 2002. Proteomic analysis of Shrimp White Spot Syndrome Virus. *Molecular and Cellular Proteomics* 1.6. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Inc. 223-231.

Fast PCR (3.0) © 1998-2004 v.3.2 (for Windows)

http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/manual.htm

Just M., J. Bonami, T. Flegel, G. Kou, D. Lightner, C. Lo, P. Loh y P. Walker 2002. *Nimaviridae* A new family infecting aquatic invertebrates. XIIth Congress of Virology. Paris.

- Kumar S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, y M. Nei 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. <http://www.megasoftware.net>
- Lan Y., W. Lu y X. Xu 2002. Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. *Virus Research* 90:269-274.
- Liu J., Yu T., Peng E., Chang S., Pien W., Lin J., Huang J., Tsai F., Huang J., Wang H., Lin Y., Lo F. y Kou H. 2001. Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of a shrimp white spot syndrome virus gene that encodes a protein kinase. *Journal Virology* 289 (2), 362-377.
- McPherson M. J. y S. G. Moller 2000. PCR. Springer-Verlag New York Inc. USA. 276.
- Mijangos Z. y R. Castro 2003. Detección del virus del syndrome de la mancha blanca (wssv) y otras enfermedades infecciosas en camarones silvestres de *Penaeus (Litopenaeus)vannamei*, frente a las costas de Sinaloa, México. 2º Foro de Camarón del Pacífico: Evaluación y Manejo. Instituto Tecnológico del Mar 05 y Universidad de Sonora. México. 12-14.
- Molina C., J. Rodríguez. J. I. Arango, F. Echeverria y Sotomayor M. 2001. Efectos conuinados de las vitaminas C y E dietéticas en la inmunorrespuesta del juvenil *Litopenaeus vannameii* antes y después de la suplementación con glucanos. CENAIM. [<http://www.cenaim.espol.edu>].

- Moon C. H., J. W. Do, S. J. Cha, W. J. Yoon, S. B. Kim, M. S. Ko, M. A. Park, J. W. Kim, S. K. Sohn, J. H. Lee y J. W. Park 2003. Highly conserved sequences of three major virion proteins of a Korean isolate of white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of aquatic organisms. Dis Aquat Org.* 53:11-31.
- Nadala E. y P. Loh 1998. A comparative study of three different isolated of white spot virus. *NOTE of Diseases of Aquatic Organisms.* 33:231-234.
- Rozas J., J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer y R. Rozas 2004. DNASP 4.0.5. Universitat de Barcelona <http://www.ub.es/dnasp/>
- Saitou Naruya y Nei Masatoshi 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol.* 4 (4):406-25.
- Sequegene, Inc. <http://www.sequegene.com/>
- Stryer L., J. Berg y J. Tymoczko 2003. *Bioquímica 5ta Edición.* Editorial Reverté, S. A. Páginas: 27, 702-704 y 708.
- Sudha P., C. Mohan, K. Shankar y A. Hedge 1998. Relationship between White Spot Syndrome Virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture* 167:95-101.
- Thompson J., T. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. Higgins 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.

- Tsai, M.F., H.T. Yu, H.F. Tzeng, J.H. Leu, C.M. Chou, C.J. Huang, C.H. Wang, J.Y. Lin, G.H. Kou, y C.F. Lo 2002. "Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase". *Journal of Virology* 277 (1). 100-110.
- Van Hulten, M.C., M.F. Tsai, C.A. Schipper, C.F. Lo, G.H. Kou, y J.M. Vlak, 2000. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. *Gen. Virol.* 81 (Pt 2), 307-316.
- Van Hulten, M.C., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst, y J.M. Vlak 2001. "The white spot syndrome virus DNA genome sequence". *Journal of Virology* 286 (1) 7-22.
- Van Hulten, M. C., M. Reijns, A. M. G. Vermeesch, F. Zandbergen y J. M. Vlak 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *Journal of General Virology* 83, 257-265.
- Vlak J. M., J-R Bonami, T. W. Flegel, G-H. Kou, D. V. Lightner, C-F. Lo, P. C. Loh y P. J. Walker 2002. *Nimaviridae* A new virus family infecting aquatic invertebrates. *ICTV*. Paris.
[<http://www.danforthcenter.org/iltab/ictvnet/images/paris/Nimaviridae.pdf>].
- Wang Q., B. T. Poulos y D. V. Lightner 2000. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. *Archives of Virology*. 145:263-274.

- Wang Q., B. L. White, R. M. Redman y D. V. Lightner. 1999. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarve and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolated of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 170: 179-194.
- Wang Q., L. Nunan y D. Lightner 2000. Identification of genomic variations amongs geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. *Dis Aquat.* 21; 43(3): 175-81.
- White A., P. Handler, E. Smith, R. Hill e I. Lehman 1983. *Principios de Bioquímica*. 2da Edición en español. Editorial McGraw-Hill. España. Páginas: 236, 307-309, 1257, 1312, 1344, 1371 y 1372.
- Wongteerasupaya Ch., P. Pungchai, B. Withyachumnarnkul, V. Boonsaeng, S. Panyim, T. Flegel y P. Walter 2003. High variation in repetitive DNA fragments length for white spot syndrome virus (WSSV) isolated in Thailand. *Diseases of aquatic organisms*. 54:253-257.
- Yang F., J. He, X. Lin, Q. Li, D Pan, X Zhang y X. Xu 2001. "Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus". *Journal of Virology*. 75(23):11811-20.

ANEXO

1. FIGURAS

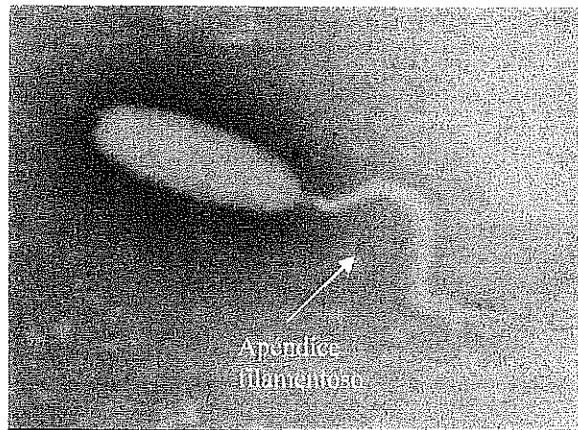


FIGURA 18. Micrografía electrónica del WSSV que muestra la morfología general del virus. Nótese la forma de ovoide, general de la estructura viral y el apéndice filamentoso en la región apical del virión, característica particular del WSSV.

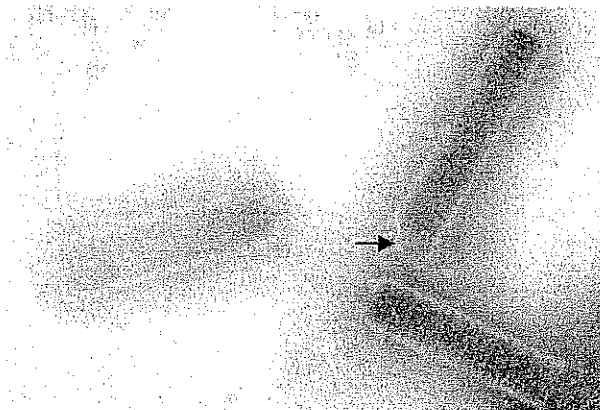


FIGURA 19. Micrografía electrónica de la nucleocápside del WSSV. Nótese la apariencia estriada o anillada “particular” de la estructura. La flecha indica un extremo abierto, otro rasgo particular de la nucleocápside del WSSV.

Imágenes tomadas por el laboratorio de virología de la Universidad de Wageningen (Bonami *et al*, 2002).

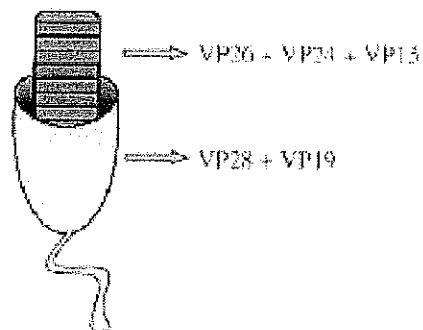


FIGURA 20. Esquema representativo de la morfología general del virión y relación de proteínas mayores asociadas a envoltura y nucleocápside del WSSV. Tomado de Van Hulten *et al*, (2002).



FIGURA 21. Juvenil de *Litopenaeus vannamei* con marchas blancas características de la enfermedad de la mancha blanca (WSD). Imagen tomada de Bonami *et al* (2002).

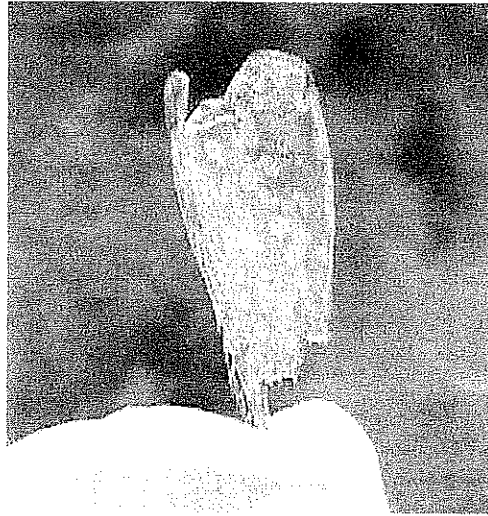


FIGURA 22. Cubierta quitinosa de un juvenil de *Litopenaeus vannamei* con “manchas blancas”, característica patológica de la enfermedad causada por el WSSV. Imagen tomada de Bonami *et al* (2002).

2. PROTOCOLOS

Protocolo de extracción

1. Homogenizar en un tubo Eppendorf 70 mg de músculo en 350 μ L de amortiguador 1 [Tris-HCl 200 mili molar (mM) a pH 7.4, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS al 0.5%) con 20 μ L de proteinasa k (20mg/mL)].
2. Agitar a 65 $^{\circ}$ C por 20 minutos.
3. Agregar 250 μ L de amortiguador 2 (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, CTAB al 2%, PVPP al 0.1%, SDS al 0.1%, mercaptoetanol al 0.2% y LiCl 5M) al homogenizado y mantener en agitación a 65 $^{\circ}$ C por 10 minutos.
4. Añadir 1 volumen (600 μ L) de cloruro de litio 5 M.
5. Aplicar vórtex por 5 segundos.
6. Conservar a temperatura ambiente por 5 minutos.
7. Centrifugar a 12,000 gravedades a temperatura ambiente por 5 minutos.
8. Tomar 700 μ L del sobrenadante y transferir a un tubo nuevo con 700 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
9. Aplicar vórtex por 5 segundos y centrifugar a 12,000 gravedades a temperatura ambiente, durante 10 minutos.

11. Tomar 700 μL de sobrenadante, transferir a un tubo nuevo y agregar 700 μL de isopropanol (Al 99 %).
12. Aplicar vórtex por 5 segundos y dejar en reposo a -70°C durante 1 hora.
13. Centrifugar a 12,000 gravedades a -4°C por 20 minutos.
14. Descartar el sobrenadante (Recuperar el precipitado por decantación).
15. Agregar 250 μL de etanol al 70 % y centrifugar a 12,000 gravedades por 5 minutos.¹⁰
16. Decantar el etanol y secar el precipitado en un horno a 55°C por ~30 minutos.
17. Resuspender en 50 μL del amortiguador TE [1X] (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM) precalentado a 65°C , y almacenar a -200°C para uso posterior.

Protocolo de purificación

1. En un tubo Eppendorf agregar 400 μL de la solución H1 (clorhidrato de guanidina concentrada, EDTA, Tris-HCl e isopropanol)¹¹ y 100 μL de producto de PCR.

¹⁰ Repetir el punto 15

¹¹ Las concentraciones de los reactivos no se encuentran disponibles, para mayor información consultar el sitio www.lafetech.com "CONCERT Rapid PCR Purification System" Cat. Series 11458.

2. Colocar la mezcla en un cartucho de carga, centrifugar durante 1 minuto a 12,000 gravedades y descartar el precipitado.
3. Colocar el cartucho de carga en un tubo de lavado, y agregar 700 μL de la solución de lavado H2 (NaCl, EDTA y Tris-HCl).
4. Centrifugar a 12,000 gravedades por 1 minuto y descartar el precipitado¹².
5. Colocar el cartucho de carga en un tubo de recuperación, agregar 50 μL de amortiguador TE precalentado a 65 ° C en el centro del cartucho e incubar a 65 ° C durante 1 minuto.
6. Centrifugar a 12,000 gravedades por 2 minutos¹³.

¹² Repetir este punto para asegurar una mayor pureza del producto.

¹³ Realizar los puntos 5 y 6 por duplicado con el fin de recuperar una mayor cantidad de producto.

3. MATERIALES, REACTIVOS Y CONDICIONES DE PCR

TABLA XII. Secuencias, longitud, temperaturas de alineamiento, fragmentos esperados y designaciones de los iniciadores diseñados.

Gen/ Iniciador		Longitud en pb	Secuencia	Tm en °C FAST PCR	Fragmento esperado en pb
VP15	F	20	GGTTGCCCCGAGGCTCCAAGA	66.9	
VP15	R	21	CAGAAGAGCGGACCCAGCCAG		178
VP19	F	21	TTCCTTTCGGCAGGACCGGAG	*	
VP19	R	21	CAGAAGAGCGGACCCAGCCAG		291
VP24	F	21	CGCTATACTGGCGGGTTTGAC	62.2	
VP24	R	21	TGTGTGGTCTCCGTCTCCAAG		302
VP26	F	25	CTTTTCTGGGTATATGGTGCTACAG	62.4	
VP26	R	23	CCTTAACAGGATTCTGGTTGGTG		1039
VP28	F	21	CGGCCATCCTCGCCATCACTG	66.6	
VP28	R	21	ATTTCCACCGGCGGTAGCTGC		534
RR1	F	21	AGGCTTAGACAGCGGTCCACC	65	
RR1	R	21	AGTTGCCCAGGATCTGTGCAG		2,284
RR2	F	21	AGCAAGCCAACCAGGTGGCTG	64.9	
RR2	R	21	AGAAGCCTAGACCTGGGCACG		1050
PK1	F	21	TCTGACCCAGAGCCCGAGCAG	*	
PK1	R	21	CATACGCTCTCGGCCTATTGG		2134

*FAST PCR no recomienda ninguna temperatura de alineamiento para este par de iniciadores debido a que el par fue resultado de la selección de cebadores individuales.

TABLA XIII. Tratamientos usados para la estandarización de la reacción de PCR con los iniciadores de Vega 2003.

Tratamiento	Temperatura en °C	Dilución	Concentración de MgCl ₂
1	49	1:0	0.75 mM
2	49	1:10	0.75 mM
3	49	1:10	1.55 mM
4	49	1:20	0.75 mM
5	50	1:0	0.75 mM
6	50	1:10	0.75 mM
7	50	1:10	1.55 mM
8	50	1:20	0.75 mM
9	51	1:0	0.75 mM
10	51	1:10	0.75 mM
11	51	1:10	1.55 mM
12	51	1:20	0.75 mM

TABLA XIV. Relación de tratamientos en las reacciones de PCR para confirmar la presencia de WSSV en las muestras.

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Carril	3	6	12	9	2	5, 13 y 14	11 y 15	1	8	4	10	7

TABLA XV. Mezcla maestra para reacciones de PCR.

Reactivo	Concentración final
dNTP'S	0.2 mM
Iniciador F	0.4 mM
Iniciador R	0.4 mM
Taq-Polimerasa	0.0096 U/μL
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	1.55 mM
ADN (molde o templete)	~200 ng/μL
Agua estéril y desionizada (H ₂ O _{dde})	Volumen necesario para 25 μL (Vf)

TABLA XVI. Condiciones de la PCR en el termociclador, para la amplificación de los fragmentos deseados.

Genes VP15, VP19, VP24, VP26 y VP28			
Fase o etapa	Ciclos	Tiempo en minutos	Temperatura en °C
Desnaturalización inicial	1	5:00	95
Desnaturalización de ciclo	30	0:50	95
Alineamiento		1:00	Gradiente de 45-70
Extensión		1:00	72
Extensión final	1	7:00	72
Genes PK1 y RR1			
Desnaturalización inicial	1	5:00	95
Desnaturalización de ciclo	10	0:50	95
Pre-alineamiento		1:00	Gradiente de 71.3-75
Extensión		2:30	72
Desnaturalización de ciclo	25	0:30	95
Alineamiento		1:00	68
Extensión		2:30	72
Extensión final	1	10:00	72
Gen RR2			
Desnaturalización inicial	1	5:00	95
Desnaturalización de ciclo	30	0:50	95
Alineamiento		1:00	Gradiente de 54.8-75
Extensión		1:00	72
Extensión final	1	7:00	40

TABLA XVII. Gradientes de temperatura para la etapa de alineamiento de la PCR, en °C.

Grad. /Temp. °C	1	2	3	4	5	6	7	8	9
45-70	70	68.2	65.2	60.6	54.1	51.3	49.8	46.8	45
54.8-75	75	73.2	70.2	65.6	59.1	54.8	51.8	50	70.2
71.3-75	75	73.3	69.3	66.7	71.3	75	73.3	69.3	66.7

4. SECUENCIAS OBTENIDAS

Las secuencias que aquí se presentan no incluyen los iniciadores, ya que fueron eliminados en el proceso de depuración de secuencias, así como algunas regiones terminales adyacentes a los iniciadores. Primeramente se presentan las siete secuencias consenso obtenidas a partir de las secuencias en sentido F y R. Dichas secuencias están presentadas en sentido río arriba.

TABLA XVIII. Secuencia amplificada del gen VP15.

1	TGGTTGCCCG AAGCTCCAAG ACCAAATCCC GCCGTGGAAG CAAGAAGAGG
51	TCCACCACTG CTGGACGCAT CTCCAAGCGG AGGAGCCCAT CAATGAAGAA
101	GCGTGCAGGA AAGAAGAGCT CCACTGTCCG TCGCCGTTCC TCAAAGAGCG
151	GAAAGAAGTC TGGAGCCCGC AAGTCAAG

TABLA XIX. Secuencia amplificada del gen VP19.

1	TTCCTTTTCGG CAGGACCGGA GCCCAGGCCG CTGGCCCTTC TTACACCATG
51	GAAGATCTTG AAGGCTCCAT GTCTATGGCT CGCATGGGTC TCTTTTTGAT
101	CGTTGCTATC TCAATTGGTA TCCTCGTCCT GGCCGTCATG AATGTATGGA
151	TGGGACCAAA GAAGGACAGC GATTCTGACA CTGATAAGGA CACCGATGAT
201	GATGACGACA CTGCCAACGA TAACGATGAT GAGGACAAAT ATAAGAACAG
251	GACCAGGGAT ATGATGCTTC TGGCTGGGTC CGCTCTTCTG

TABLA XX. Secuencia amplificada del gen VP24.

1	CGCTATACTG GCGGGTTTGA CATTGATACT CGTGGTTATA TCTATAGTTG
51	TAACCAACAT AGAACTTAAC AAGAAATTGG ACAAGAAGGA TAAAGACGCC
101	TACCCTGTTG AATCTGAAAT AATAAACTTG ACCATTAACG GTGTTGCTAG
151	AGGAAACCAC TTTAACTTTG TAAACGGCAC ATTACAAACC AGGAACTATG
201	GAAAGGTATA TGTAGCTGGC CAAGGAACGT CCGATTCTGA ACTGGTAAAA
251	AAGAAAGGAG ACATAATCCT CACATCTTTA CTTGGAGACG GAGACCACAC
301	A

TABLA XXI. Secuencia amplificada del gen VP26.

1	CCAACACGTA	AAGGAAGAAC	TTCCATCTAA	AACAAAGAAA	AATGGAATTT
51	GGCAACCTAA	CAAACCTGGA	CGTTGCAATT	ATTGCAATCT	TGTCCATTGC
101	AATCATTGCT	CTAATCGTTA	TCATGGTTAT	AATGATTGTA	TTCAACACAC
151	GTGTTGGAAG	AAGCGTCGTC	GCTAATTATG	ATCAGATGAT	GCGAGTCCCA
201	ATTCAAAGAA	GGGCAAAGGT	AATGTCAATT	CGTGGAGAGA	GGTCCTACAA
251	TACTCCTCTT	GGAAAGGTGG	CCATGAAGAA	TGGTCTCTCC	GATAAGGACA
301	TGAAGGATGT	TTCTGCTGAT	CTTGTCATCT	CTACCGTCAC	AGCCCCAAGG
351	ACTGATCCCG	CTGGCACTGG	GGCCGAGAAC	TCTAACATGA	CTTTGAAGAT
401	CCTCAACAAC	ACTGGCGTCG	ATCTCTTGAT	CAACGACATT	ACTGTTCCGC
451	CAACTGTTAT	TGCAGGAAAC	ATTAAGGGAA	ATACTATGTC	GAACACTTAC
501	TTCTCGAGCA	AGGACATTAA	ATCTTCATCT	TCAAAAATTA	CCCTCATTGA
551	CGTGTGCAGC	AAATTTGAAG	ACGGCGCAGC	CTTCGAAGCT	ACAATGAACA
601	TTGGATTAC	CTCCAAGAAT	GTGATCGATA	TCAAGGACGA	AATCAAGAAG
651	AAGTAAAGTG	GGAATTGTAC	AAATATAAAG	GTTTTGTTTG	AATAAAAATA
701	CAAGTAATTT	TATACCATCT	TTTATTTTTT	TAATCCTTTG	AAATGTATCT
751	TGTTACCTGA	CTCATTACAA	ATTTCTCATC	ATCCCTAAAG	AATGTGTACA
801	AATCATCATT	AGCAAATGTA	CAAATAAAGT	TAGTCAAAAA	CACACAAATA
851	TTAATCTTCA	TGTTGTAAGG	AATGTTGGAC	ACAACAGTAC	CCAGAACACT
901	GTTTCATGATC	ATGCTGTTAC	TCTGCAACAA	TTCCTTACTT	TCAATAGCTC
951	CGGCCACCCT				

TABLA XXII. Secuencia del gen VP28, obtenida con los iniciadores de la tabla XII.

1	TCGGCCATCC	TCGCCATCAC	TGCTGTGATT	GCTGTATTTA	TTGTGATTTT
51	TAGGTATCAC	AACACTGTGA	CCAAGACCAT	CGAAACCCAC	ACAGACAATA
101	TCGAGACAAA	CATGGATGAA	AACCTCCGCA	TTCCTGTGAC	TGCTGAGGTT
151	GGATCAGGCT	ACTTCAAGAT	GACTGATGTG	TCCTTTGACA	GCGACACCTT
201	GGGCAAAAATC	AAGATCCGCA	ATGGAAAGTC	TGATGCACAG	ATGAAGGAAG
251	AAGATGCGGA	TCTTGTCATC	ACTCCCGTGG	AGGGCCGAGC	ACTCGAAGTG
301	ACTGTGGGGC	AGAATCTCAC	CTTTGAGGGA	ACATTCAAGG	TGTGGAACAA
351	CACATCAAGA	AAGATCAACA	TCACTGGTAT	GCAGATGGTG	CCAAAGATTA
401	ACCCATCAAA	GGCCTTTGTC	GGTAGCTCCA	ACACCTCCTC	CTTCACCCCC
451	GTCTCTATTG	ATGAGGATGA	AGTTGGCACC	TTTGTGTGTG	GTACCACCTT
501	TGGCGCACCA	ATTGCAGCTA	CCGCCGGTGG	AAA	

TABLA XXIII. Secuencia del gen VP28, obtenida mediante la utilización de los iniciadores de Vega (2003).

1	CTCGCTTGCC	AATTGTCCTG	TTACGTACTC	TGTGGTTTCA	CGAGGTTGTC
51	ATCACCAAAG	GTAACCTTTT	TTTTTGTCTT	CGCCGACAAA	ACGACATCTT
101	AATAACCAAG	CAACGTTCGA	TAAAGAAAAA	AACTCGTCAT	GGATCTTTCT
151	TTCACTCTTT	CGGTCGTGTC	GGCCATCCTC	GCCATCACTG	CTGTGATTGC
201	TGTATTTATT	GTGATTTTFA	GGTATCACAA	CACTGTGACC	AAGACCATCG
251	AAACCCACAC	AGACAATATC	GAGACAAACA	TGGATGAAAA	CCTCCGCATT
301	CCTGTGACTG	CTGAGGTTGG	ATCAGGCTAC	TTCAAGATGA	CTGATGTGTC
351	CTTTGACAGC	GACACCTTGG	GCAAAATCAA	GATCCGCAAT	GGAAAGTCTG
401	ATGCACAGAT	GAAGGAAGAA	GATGCGGAT		

La siguiente secuencia, se obtuvo mediante la fusión de las cuatro secuencias obtenidas de los iniciadores presentados en la tabla XII del gen VP28 y los iniciadores de Vega (2003). Dicha secuencia comprende un fragmento de 44 pb de la proteína cinasa, localizado en la región inicial de la secuencia (base número 1 a la 44), mas un fragmento de 657 pb (base 45 a la 701) correspondientes al gen VP28 que suman un total de 701 pb.

TABLA XXIV. Secuencia completa del gen VP28 y una región de 44 bases del gen PK.

1	CTCGCTTGCC AATTGTCCTG TTACGTACTC TGTGGTTTCA CGAGGTTGTC
51	ATCACCAAAG GTAACCTTTT TTTTGTCCCT CGCCGACAAA ACGACATCTT
101	AATAACCAAG CAACGTTCTGA TAAAGAAAAA AACTCGTCAT GGATCTTTCT
151	TTCACTCTTT CGGTCGTGTC GGCCATCCTC GCCATCACTG CTGTGATTGC
201	TGTATTTATT GTGATTTTTA GGTATCACAA CACTGTGACC AAGACCATCG
251	AAACCCACAC AGACAATATC GAGACAAACA TGGATGAAAA CCTCCGCATT
301	CCTGTGACTG CTGAGGTTGG ATCAGGCTAC TTCAAGATGA CTGATGTGTC
351	CTTTGACAGC GACACCTTGG GCAAATCAA GATCCGCAAT GGAAAGTCTG
401	ATGCACAGAT GAAGGAAGAA GATGCGGATC TTGTCATCAC TCCCGTGGAG
451	GGCCGAGCAC TCGAAGTGAC TGTGGGGCAG AATCTCACCT TTGAGGGAAC
501	ATTCAAGGTG TGGAACAACA CATCAAGAAA GATCAACATC ACTGGTATGC
551	AGATGGTGCC AAAGATTAAC CCATCAAAGG CCTTTGTCGG TAGCTCCAAC
601	ACCTCCTCCT TCACCCCGT CTCTATTGAT GAGGATGAAG TTGGCACCTT
651	TGTGTGTGGT ACCACCTTTG GCGACCAAT TGCAGCTACC GCCGGTGGAA
701	A

TABLA XXV. Secuencia que se obtuvo del gen RR2.

1	TCTCTTTTCA	AAAAAGTTGG	TCTTATTCTC	GAGGGAAATA	TTGTCCATGA
51	ATGGGAAGGG	GTTGGTAACA	TTATAGTGCT	TTTCTAGTCC	CATTTCAACC
101	AATAGTTTAT	CTGCCACAAA	TTCAATGTAC	TGGCTCATCA	ACTTGCAGTT
151	CATTCCCCT	AATTTAACAG	GCAGGGAAAC	TGTGAGAAAT	TCTTGTTCAA
201	TTCGGACGGC	TTCAGTGACA	ATTTCAAGAA	TCCTTTCTCT	TGATGGGGTA
251	TCAACAAAAC	CCTTTTTTCAA	CAGCATGCAT	GCAAAGTCGC	GATGAAGACC
301	TTCGTCCCTA	GAAATGAACT	CATTGGAGGA	GGTGAGACCA	GGCAAAAATAC
351	CCCTGTTCTT	GATCCAGAAA	ATGGATGCGA	ATGCACCACT	AAAGAAGATT
401	CCTTCAACTG	CAGCAAAGGC	AACAATTAGT	TCCGCCAAAT	CGTTATTGCT
451	TTGCATCCAA	TTAATAGCCC	ACTGCTCCTT	CTTCTTGATG	GCGGGGAAGT
501	GTTGTGCAGC	GTAAACAAG	ATAGCCTTGT	CTTTTTTCGTC	GGGCACCAGT
551	CTATCAATCA	GTTCTCCGTA	GACGTTGCCA	TGAATACTCT	CCATTCCAAC
601	TTGGAAGTCA	AAGAACTCC	TCGCTTCTGG	AATCTGCGCC	ACTTGACGAA
651	GACGTGTTGT	AAGATTTTCA	ATTACAATTC	CGTCAGAGGA	TGCAAAGAAC
701	GCCAGAATCT	GGAGAATGAA	ATCCTTCTCA	TCTTGAGTGA	GTTTCTCCCA
751	ATCTTTAGGA	TCCCTTTCGA	AATCAATCTC	TTCCAATGTC	CAAAAACAGG
801	CAACCTCTTT	TTGTACATT	TCCCAGAGAT	CTTCATGGAC	AATGGGGCGG
851	GATACAAAAC	GGTTGGGGTT	TTCTCTTGTA	AGTAAGTGTT	TAGACGTATC
901	TACTTGCATA	ATGAGTTTTT	TGGTGAATTT	GTCAAACACT	TCCTGGGCAA
951	TCCTCTTTTC	CTCCTCGGTT	TTATATTCTG	ACTT	

TABLA XXVII. Secuencia amplificada del segmento del gen RR1 con el iniciador "R", presentada en sentido "río arriba".

1	GCAGAAGAAA	TGCCGGTAAA	GAAGATTGAG	GCCGAGGGAT	CTTTTCCCAG
51	CTATTCNNGG	TATNTGATCT	CTTCATGGAG	AGAGTGAAGG	CTGGGAANAA
101	TTNGGTCCCT	GATGTGCCCC	CACGAGTTGC	CCTGGCCTTT	CCGACGTCCA
151	TGGCGAAGAG	TTTAAGGCGT	TGTNCGAGAA	ATATGAGGGC	TGAAGGCAAA
201	GGTAAAGAGG	TGGTGAAGGC	ACGTGCATTA	TTCGACCAAA	TTAATTCTGC
251	ACGTATCGAA	ACTGGAACAC	CTTATGTGTG	CTTTAAGGAT	ACCATCAATA
301	GAAAGTCTAA	CCAAGAAAAT	GTCGGCATCA	TCAAGTCTTC	AAATTTGTGC
351	ACTGAAATTG	TCCAGTACAG	TGATTCCGGAG	GAAACTGCAG	TGTGCAATTT
401	GGCTTCTATC	GCAGTCAACA	AGTTTGTGAA	GTATTCTCCC	ATCCCTTCCC
451	TAAGGCCCTA	TGTTGATTAC	CGGGAGATGA	AGAGGGTTGT	AAAAATCATG
501	ACCAGAAATC	TCGACAAGGT	GATTGATGTC	AATTTCTATG	CAGTTGACAA
551	GACCCGCATT	TCCAATATGA	AAACTAGGCC	AATGGGATTG	GGTGTGCAGG
601	GACTAGCAGA	TTTGTTCCTC	AAACTCAGAA	TCCCCTTCGA	ATCTGAAGAA
651	GCGGCACTAA	TTAACAAGAG	GATTTTTGAA	ACTATATACT	ATGGTGCCTT
701	GGAAGCTTCA	TGTGAAATTG	CAAAGAAAAA	GGGAGAAACA	TATGAGCTGT
751	TTGAGGGTAG	TCCTTTGAGC	AAAGGGATTT	TCCAATTGGA	CATGGGGAAG
801	GAAAATATTA	AGAATAGGGA	CATATATTTT	AACTCTTTGC	CAATTCATCG
851	TATTGNGAGC	ANTTGAGAAG	GGACACTTAT	GAAGTATGGT	GTTCCACAAT
901	TCAATGT				

TABLA XXVIII. Secuencia amplificada del segmento del gen PK1 con el iniciador "F".

1	CCCTCCCTCA	GATTCTCCTT	ATTCTCTTAG	GCCCATGAAG	AGACTAAAGA
51	AGAATAATGG	AGAGGTGGGA	GGAAAAGCAC	CGCCTCCTGT	GACTTTGAGG
101	CTCCGCGAGG	ACTACGAGAG	CACACCTTAC	AACTTTAATA	GAAATAAGAA
151	GAAGAGGCCT	ATTACTATTG	ATGAAAATCA	ATTTGCAACA	TTAAATCCAA
201	CGTATGCGAC	AGACATTATC	AAGAAGCAGC	AATTGCCTTC	TGTTAGTGCC
251	GCGTCTGTGT	TGAGGAAGCA	CCGCGCCAAT	GCCGACACCC	AGTACAGAAA
301	AAGATTCTCT	CATCCAAATT	GTGCAAATTT	CTCTACTGTC	AATTTGAAGG
351	CTAGAGACTA	TACTCCACTG	TCTGTCCTCC	GTTCCCATGT	CAAGGGGCCA
401	AAACACTTGA	AATCTTCTTG	TGATACCGTG	ACTGAAACAA	ATGTAGTAAA
451	GAGGAACTTT	TCTTCCATTG	ACAAGTGGGT	CAAGCTAGAA	AAACCCCGT
501	GTTACTTTGC	AGTGGCAGAG	GCTGATACCA	ATATTGCAGC	CGGTCTAGAA
551	TCTCCGTTCC	ATTTGATTAG	ACAGGCCGCA	AAATTAGGCC	TCATTTCTGA
601	CGTGCAAGAT	GTGTCGTCCA	ACTACGAGAC	CATAAAACAG	AGCTGTATTG
651	ACGCAAAGGA	AAAAGCGTCC	AAGTTTTTGT	GGTCTAACAA	CCGTACTAAA
701	CAACCCCC				

TABLA XXIX. Secuencia amplificada del segmento del gen PKI con el iniciador "R".

1	NCNTGGGGAT	TNTTTCTGGA	GAAGAAAANC	TNCACTCCTG	GGGGAGGNCC
51	ACTGNCCCAA	TGTANGAAAT	NGGGAAANGT	TTCCCGCCAG	AAAATATTCC
101	TGTACCAGCC	ACACGTCCAA	NCCAGAATAT	GCTTCTCAAG	GTCGTAATGA
151	TTGGACCATC	TGAATTATAT	CTCGAAGTTA	AAGTCGGGGT	ATATTACATG
201	CTTGAAACCT	GGAAAAGTTA	TCAAGTTTTA	TGACGGACAA	GGAAATGTAC
251	TGTGAATTTG	TATTTGAAAC	TGTTTTTAGT	CACGCTCCTG	AGGGAAGAAT
301	GAAAGGCGCA	GTAGGTGTGA	GAAAGATGTG	TGTTGAAGGT	TTTTGTGTCG
351	AGATGGATTT	TGCAGGCATT	TCTGTGATTG	ATGTATTAAA	TGGAGACCTG
401	AAATGTAAAA	TGGACGAGAA	TGTTGTACAG	CAACCTAACC	CCTCGACTAC
451	TTCTCCAAG	CCAGCCGCTG	AGCTCATGCA	AGATCATGGC	AGCTTGTGTA
501	GGATGAGGGA	TACTCTGTAC	GGTGTTAGGA	TGCTTCAAGC	TACTGGCCGC
551	CTGCCTGAAG	GTCTACAATC	TAAATGCAAG	AAACCCATTA	CGGATTCAAT
601	TTCAGCCATA	GCTATCGTTG	GAAAAATGAG	GGAGAGAATG	TTAAACCAAT
651	TGCCCTTTGT	TTTGGTAGAA	ATTGTAAATA	TTGTCACTCG	GTTGTCTCAA
701	CAAGGATTAG	TGAATCCGGA	CATAAAAAGT	GACAATATAG	TAATTGATGG
751	AATAACTGGT	CAACCTAAGA	TGATTGATTT	TGGTTTAATT	GTACCATGTA
801	AAAAGTACTA	CAATTTTAAA	TGTTGGGGAA	CTGATGAGAG	GTTCTTTAGT
851	AACCATCCTC	ATACAGCTCC	TGAATTTATT	AACAGTGAGT	TGTGTTCAGA
901	AACTGCCATG	ACTTTTGGGT	TGGCTTATTT	GTTAATAGAC	ATGTTGTCCA
951	TTTTGATTAA	GAGAACTGCA	GATTTGTCGG	CCAATTCTAT	CTATACAAAC
1001	ATTGCCATTT	TTGTCCTATT	GATCTAAAAT	GAGCCCAGAA	G

5. ÍNDICES DE DISTANCIA GENÉTICA

TABLA XXX. Matriz de distancia genética entre aislados, gen VP15: índice de distancia Jukes-Cantor.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	-												
1	0.000	-											
2	0.000	0.000	-										
3	0.000	0.000	0.000	-									
4	0.000	0.000	0.000	0.000	-								
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-							
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-						
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-					
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-				
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-			
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-		
11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	
12	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	-
13	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.023

TABLA XXXI. Matriz de distancia genética entre aislados, gen VP19: índice de distancia genética Jukes-Cantor.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	-												
1	0.000	-											
2	0.000	0.000	-										
3	0.004	0.004	0.004	-									
4	0.004	0.004	0.004	0.007	-								
5	0.004	0.004	0.004	0.007	0.000	-							
6	0.004	0.004	0.004	0.007	0.000	0.000	-						
7	0.004	0.004	0.004	0.007	0.000	0.000	0.000	-					
8	0.004	0.004	0.004	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	-				
9	0.004	0.004	0.004	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	-			
10	0.004	0.004	0.004	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	-		
11	0.004	0.004	0.004	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	-	
12	0.004	0.004	0.004	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.007	0.007	-
13	0.004	0.004	0.004	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007

TABLA XXXII. Matriz de distancia genética entre aislados, gen VP24: índice de distancia genética Jukes-Cantor.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	-													
1	0.000	-												
2	0.000	0.000	-											
3	0.000	0.000	0.000	-										
4	0.000	0.000	0.000	0.000	-									
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-								
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-							
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-						
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-					
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-				
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-			
11	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	-		
12	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	-	
13	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.010	0.010	-

TABLA XXXIII. Matriz de distancia genética entre aislados, gen VP26: índice de distancia genética Jukes-Cantor.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	-															
1	0.000	-														
2	0.000	0.000	-													
3	0.000	0.000	0.000	-												
4	0.000	0.000	0.000	0.000	-											
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-										
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-									
7	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	-								
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	-							
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	-						
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	-					
11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	-				
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	-			
13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-		
14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	
15	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	-

TABLA XXXIV. Matriz de distancia genética entre aislados, gen VP28: índice de distancia genética Jukes-Cantor.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
0	-																		
1	0.000	-																	
2	0.000	0.000	-																
3	0.000	0.000	0.000	-															
4	0.000	0.000	0.000	0.000	-														
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-													
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-												
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-											
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-										
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-									
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-								
11	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	-							
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	-						
13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	-					
14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	-				
15	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.002	0.002	0.002	-			
16	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.002	0.004	-		
17	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	-	
18	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.005	-

TABLA XXXV. Matriz de distancia genética entre aislados, gen RR2: índice de distancia genética Jukes-Cantor.

	1	2	3	4	5
1	-				
2	0.000	-			
3	0.000	0.000	-		
4	0.000	0.000	0.000	-	
5	0.001	0.001	0.001	0.001	-

FE DE ERRATAS

Pág.	Ubicación	Dice	Debe decir
25	Pie de figura 6, línea 4	carriles 9, 19 y 29 son controles negativos, los "L"	carriles 9, 10, 19, 20, 29 y 30 son controles negativos, "L"
26	Pie de figura 7, línea 3.	de las muestras (9, 10, 19 y 20)	de las muestras (9, 10, 20 y 21)
49	Discusión, línea 10.	mutación que la diferencia de Taiwán.	mutación compartida con la secuencia gi: 15384186, en la posición 171 (ORF 2801), que las diferencia del resto de los aislados.
52	Conclusión 2, líneas 5 y 6.	de las de China y Tailandia, asimismo diferencia entre la cepa de China y Tailandia.	de las de China y Tailandia.
52	Faltó incluir un punto en la conclusión acerca de la mutación del gen VP19 en la posición 171 que permite distinguir a la cepa de China del resto de los aislados y la agrupa con la secuencia gi: 15384186		